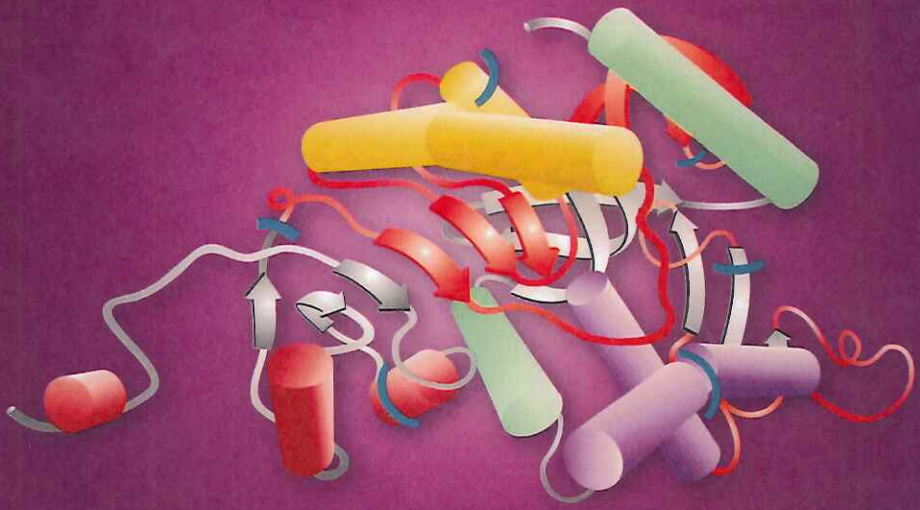
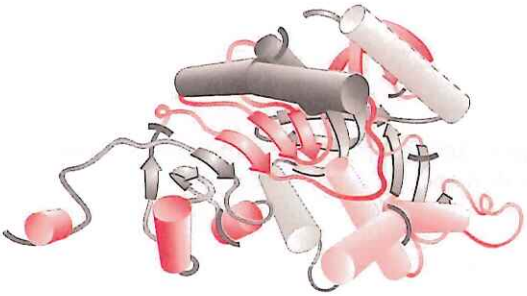
QUÍMICA BIOLÓGICA



Antonio Blanco | Gustavo Blanco

10ª Edición

Editorial El Ateneo



QUÍMICA BIOLÓGICA

Antonio Blanco
Profesor Emérito,
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Córdoba.
Córdoba. Argentina.

Gustavo Blanco
Profesor Titular
Director (Chairman) del Departamento de
Fisiología Molecular e Integrativa
Kansas University Medical Center
Kansas City, EE.UU.

Editorial El Ateneo

Blanco, Antonio
Química biológica / Antonio Blanco y Gustavo Blanco. - 10a ed. -
Ciudad Autónoma de Buenos Aires. : El Ateneo, 2016.
736 p. ; 18x26 cm.

ISBN 978-950-02-0904-5

1. Ciencias Médicas. 2. Química. I. Blanco, Gustavo
CDD 540

Química biológica
© Antonio Blanco y Gustavo Blanco, 2016

Derechos exclusivos de edición en castellano para todo el mundo
© Grupo ILHSA S.A. para su sello Editorial El Ateneo, 2016
Patagones 2463 - (C1282ACA) Buenos Aires - Argentina
Tel: (54 11) 4943 8200 - Fax: (54 11) 4308 4199
editorial@elateneo.com - www.editorialelateneo.com.ar

1ª edición en Editorial El Ateneo: abril de 1988
10ª edición: febrero de 2016

ISBN 978-950-02-0904-5

Diseño de interiores y cubierta: Claudia Solari

Impreso en Leva Impresores S. A.,
en febrero de 2016.

Queda hecho el depósito que establece la ley 11.723.
Libro de edición argentina.

Prólogo de la novena edición

La buena recepción dispensada a este texto desde su aparición, allá por el año 1988, hizo que nos impusiéramos la tarea, en sucesivas versiones, de mantenerlo actualizado. En un campo en el cual los conocimientos evolucionan con asombrosa rapidez, es imperioso acompañar el ritmo de esa evolución.

La actualización de un texto de Química Biológica dirigido primariamente a estudiantes de grado plantea el interrogante: ¿Cuánto de la enorme y creciente masa de información existente es aconsejable ofrecer para asegurar una adecuada preparación básica?

Según criterios elaborados a lo largo de muchos años de experiencia docente, nuestra respuesta ha sido brindar los conocimientos elementales indispensables e incorporar nuevas adquisiciones en la medida que cuenten con sólido apoyo experimental, hayan alcanzado amplia aceptación de la comunidad científica y sean relevantes para la formación del futuro profesional.

En esta oportunidad se ha realizado una extensa revisión de la edición anterior, se han incorporado nuevos temas, agregado capítulos y redistribuido algunas secciones a fin de lograr una mejor organización del contenido.

La información que se expone procura satisfacer los requerimientos del curso regular de la materia; se han ampliado más allá de esos límites los capítulos que pueden servir de consulta en asignaturas afines o en etapas más avanzadas de la carrera.

Originalmente esta obra fue gestada en la entonces Cátedra de Química Biológica (hoy de Bioquímica y Biología Molecular) de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba (Argentina). La colaboración de los integrantes de la Cátedra, con su aporte de valiosas sugerencias, ha sido permanente. Mucho agradecemos ese constante apoyo.

Siempre ha sido nuestra intención hacer del texto una herramienta útil para el aprendizaje de la Bioquímica a nivel inicial. Esperamos que esta novena edición cumpla con ese propósito.

Prólogo de la décima edición

Es ésta una versión revisada y actualizada de la Novena Edición. Se han ampliado las referencias a trastornos clínicos relacionados con alteraciones bioquímicas y se ha agregado un nuevo capítulo (el 23 sobre Regulación de la expresión génica).

Agradecemos la valiosa colaboración de la Dra. Alicia Bollati en la corrección de originales, que ha contribuido significativamente a mejorar la presentación del libro.

Los autores

Índice

Introducción 1
Tabla periódica de los elementos 5
1. Composición química de los seres vivientes 7
2. Agua 9
3. Proteínas 23
4. Hidratos de carbono 71
5. Lípidos 95
6. Ácidos nucleicos 115
7. Elementos de termodinámica y cinética bioquímicas 133
8. Enzimas 143
9. Oxidaciones biológicas. Bioenergética 165
10. Antioxidantes 189
11. Membranas 197
12. Digestión. Absorción 227
13. Metabolismo 247
14. Metabolismo de hidratos de carbono 255
15. Metabolismo de lípidos 291
16. Metabolismo de aminoácidos 327
17. Metabolismo del hemo 357
18. Metabolismo de purinas y pirimidinas 367
19. Integración y regulación del metabolismo 377
20. Metabolismo en algunos tejidos 397
21. La información genética (I). Replicación y transcripción 413
22. La información genética (II). Biosíntesis de proteínas 439
23. Regulación de la expresión génica 467
24. Modificaciones postraducción de proteínas 475
24. Bases bioquímicas de la endocrinología (I). Receptores y transducción de señales 485
25. Bases bioquímicas de la endocrinología (II). Hormonas y otros intermediarios químicos 509
26. Vitaminas 573
27. Balance hídrico y equilibrio ácido-base 613
28. Componentes minerales esenciales 635
29. Bases moleculares de la inmunidad 661
30. Hemostasis 695
31. Apoptosis 703
Índice alfabético 709

Introducción

La Química Biológica, ciencia que procura explicar los procesos vitales a nivel molecular, comprende dos grandes áreas: una está destinada al estudio de los componentes de los seres vivos y ha sido llamada *Bioquímica estática* o *descriptiva*; la otra investiga las transformaciones químicas que acontecen en los sistemas biológicos y suele denominarse *Bioquímica dinámica*. Ambas han sido escenario de un asombroso desarrollo en los últimos cien años.

Bioquímica descriptiva. El conocimiento de los componentes de los seres vivos demanda intensos esfuerzos de investigación. La empresa es ardua, dada la gran complejidad de la materia viviente. Aun el organismo unicelular más simple contiene miles de sustancias diferentes.

El estudio de los constituyentes de células y tejidos exige su separación, purificación, determinación de estructura y propiedades. Al comienzo, los bioquímicos trataron con las sustancias más sencillas, que podían extraerse fácilmente de organismos animales o vegetales, o bien obtenerse por descomposición de sustancias más complejas.

Como en otras disciplinas científicas, el avance de la Química Biológica ha ido de la mano de los progresos tecnológicos. La disponibilidad de instrumental y métodos cada vez más sensibles, penetrantes y resolutivos, permitió superar limitaciones y enfrentar el desafío que plantea el estudio de moléculas de organización más compleja. La separación, purificación y análisis de macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos), que alguna vez fueron inimaginables, se convirtieron hoy en moneda corriente en los laboratorios bioquímicos gracias a nuevos recursos técnicos. En este campo hemos asistido a progresos extraordinarios en los últimos setenta años.

El conocimiento de la estructura de moléculas que desempeñan un papel protagónico en los procesos biológicos permitió adentrarse en su intimidad, interpretar sus funciones sobre bases más firmes y explicar sus mecanismos de acción.

Bioquímica dinámica. En todo ser vivo ocurren a cada instante innumerables reacciones químicas, cuyo estudio se engloba bajo el nombre de *metabolismo*. Naturalmente, los primeros interrogantes estaban relacionados con los cambios que experimentan las sustancias incorporadas al organismo con los alimentos y el origen de los productos de desecho; más tarde se encaró el estudio de la síntesis de los propios componentes del organismo.

El gran desarrollo de los estudios metabólicos fue favorecido por el progreso de la enzimología. El mejor conocimiento de las *enzimas*, catalizadores de las reacciones bioquímicas, ha sido factor decisivo en la actual comprensión de los fenómenos biológicos.

La mayor parte de las conversiones químicas en los seres vivos se cumple en forma gradual, a través de series de reacciones o *vías metabólicas*, que en etapas sucesivas convierten el compuesto inicial en un producto final determinado.

Desde las primeras observaciones en la segunda mitad del siglo XIX hasta la actualidad, los hallazgos de miles de investigadores han ido brindando una visión de la gran variedad y complejidad de esas vías y de sus interrela-

ciones. Esto se suele representar en los llamados "mapas metabólicos" que representan, como en una intrincada red de caminos, la existencia de interconexiones, desvíos y encrucijadas en los recorridos que pueden cumplir diferentes compuestos. El conjunto da la impresión de una confusa maraña cuyo funcionamiento ordenado es difícil de concebir. Sin embargo, en el individuo normal todo transcurre con un ritmo y magnitud exquisitamente adaptados a las necesidades de cada célula en particular y del organismo en general. Esto depende de la existencia de dispositivos de control que ordenan el "tránsito" a lo largo de las distintas vías metabólicas. La investigación de los procesos de regulación e integración ha sido particularmente activa en los últimos sesenta años. Se han puesto en evidencia múltiples y sutiles mecanismos de modulación de la actividad de enzimas, con los cuales se logra adecuar el flujo de compuestos a través de una vía determinada a las necesidades locales en un momento dado.

En los seres multicelulares, los sistemas nervioso y endocrino aseguran el funcionamiento integrado del organismo. Ante determinados estímulos, estos sistemas liberan sustancias intermediarias o *mensajeros químicos* (neurotransmisores, hormonas, citoquinas y otros factores) que ponen en marcha, con gran selectividad, *sistemas de transmisión* o *transducción de señales* hacia el interior de las células y provocan respuestas definidas. Los datos disponibles actualmente en el campo de la transducción de señales celulares muestran una llamativa complejidad, expresada por la diversidad de integrantes de esos sistemas y por sus frecuentes conexiones e interacciones.

La unidad del mundo biológico. Del cúmulo de conocimientos adquiridos surge la siguiente evidencia: a pesar de la enorme diversidad en el mundo de los seres vivos, existe una notable unidad en las estructuras y en los mecanismos básicos sobre los cuales se asienta y transcurre la vida. Así, las macromoléculas fundamentales de los organismos vivientes, vale decir, las proteínas y los ácidos nucleicos, son distintos de especie a especie y aun de individuo a individuo. Pero la estructura básica es la misma: están construidas por el ensamble de unidades idénticas en todos los seres, siguiendo un mismo plan general. Todas las proteínas existentes en la naturaleza resultan del enlace, en extensas cadenas, de veinte unidades fundamentales (aminoácidos). Todos los ácidos nucleicos están compuestos por la unión, en larguísimas hebras, de cuatro unidades constitutivas (nucleótidos).

Los mecanismos metabólicos, por su parte, también muestran gran semejanza aun en especies filogenéticamente muy distantes. Las reacciones mediante las cuales el músculo esquelético humano deriva energía para su contracción reproducen, en casi todas sus etapas, las transformaciones que acontecen en la levadura y otros microorganismos durante el proceso de fermentación. La comprensión del funcionamiento de vías metabólicas en tejidos de seres multicelulares de gran complejidad se alcanzó en muchos casos estudiando organismos más simples que realizan iguales transformaciones.

El organismo como máquina transformadora de energía. De acuerdo con sus requerimientos, los organismos pueden dividirse en *autótrofos* y *heterótrofos*. Los vegetales verdes son autótrofos, pueden sintetizar compuestos orgánicos complejos (hidratos de carbono, grasas, ácidos nucleicos y proteínas) a partir de sustancias inorgánicas muy simples (agua, dióxido de carbono, nitrógeno, fosfatos). La energía para estas síntesis proviene del sol.

Los animales multicelulares, en cambio, son heterótrofos, dependen de la ingesta de compuestos producidos por otros seres. Normalmente la dieta incluye hidratos de carbono, lípidos, proteínas, vitaminas y minerales. En general, los cambios experimentados por las sustancias incorporadas al organismo tienden a cumplir dos fines principales: a) transferencia de la energía contenida en esas sustancias y b) obtención de materia prima para la síntesis de las moléculas propias. Esta síntesis, como otras actividades de las células, requiere energía.

El aprovechamiento de la energía química existente en diversos componentes de la dieta representa una parte muy importante de las actividades celulares. Los organismos vivos pueden ser considerados verdaderas máquinas de conversión de energía. Las reacciones químicas llamadas exergónicas, esto es, las que transcurren con liberación de energía, frecuentemente se acoplan con otras que la requieren (endergónicas). En muchas de esas reacciones se producen moléculas capaces de captar, retener y finalmente ceder esa energía cuando sea necesaria. Existen varias de estas moléculas; la principal de ellas en todas las especies vivientes es la *adenosina trifosfato* o *ATP*, el más importante portador de energía química fácilmente utilizable.

Capacidad de reproducción. Una propiedad distintiva de los seres vivos es su capacidad de reproducirse y de crear, generación tras generación, otros organismos semejantes a sus antecesores en estructura externa e interna y en características fisiológicas.

Ello es posible gracias a la transmisión de caracteres heredables, contenidos como *informa-*

ción genética en las enormes moléculas de *ácido desoxirribonucleico* (*ADN*) constituyentes de los cromosomas. Esa información está representada por la secuencia de nucleótidos del ADN, la cual es transmitida de padres a hijos y de célula a célula, y en última instancia expresada por la síntesis de proteínas con características únicas para cada especie o aun para cada individuo. El "código" o "lenguaje" con el cual se inscribe la información genética del ADN es universal, es decir, es prácticamente el mismo para todos los seres vivos. Esto señala nuevamente la unidad del mundo biológico; nos habla de un origen común de toda la materia viviente.

Los cambios (mutaciones) operados en el "mensaje genético" a través de millones y millones de años han creado la actual diversidad y las características peculiares adquiridas por cada especie durante ese proceso de evolución.

El avance de los conocimientos en esta área ha sido notable en las últimas décadas. No sólo se ha logrado una mejor comprensión de los mecanismos responsables de la transmisión y eventual modificación de los caracteres hereditarios; también se han creado posibilidades de aplicación imprevisibles hasta hace pocos años. En el seno de la Bioquímica se ha desarrollado una nueva disciplina, la *Biología Molecular*, que cuenta en su haber con aportes sorprendentes, como el haber descifrado la secuencia completa del ADN que constituye el genoma humano y el de cada vez mayor número de especies vegetales y animales, la manipulación de genes, la creación de organismos transgénicos con propiedades inéditas y la terapia de enfermedades hereditarias.

La aplicación de estos conocimientos ha posibilitado los enormes avances de la biotecnología y la medicina a los que asistimos en la actualidad.

Más allá de los indudables beneficios que las conquistas de la Biología Molecular reportan a la humanidad, el progreso conlleva nuevos problemas de orden ético que el científico, como miembro de la sociedad, no debe soslayar.

Límites de la Química Biológica. Los avances de la Química Biológica han posibilitado la apertura de nuevos horizontes y han impulsado el desarrollo de otras disciplinas, como la Biología Celular. El resultado ha sido una gran expansión de la Bioquímica hacia los territorios de reciente conquista de la Biología Molecular y hacia zonas de interdependencia y superposición con la Biología Celular. Los límites se han tornado imprecisos; en la actualidad, un texto de Química Biológica no puede eludir la "invasión" de áreas del conocimiento que no hace mucho le eran ajenas.

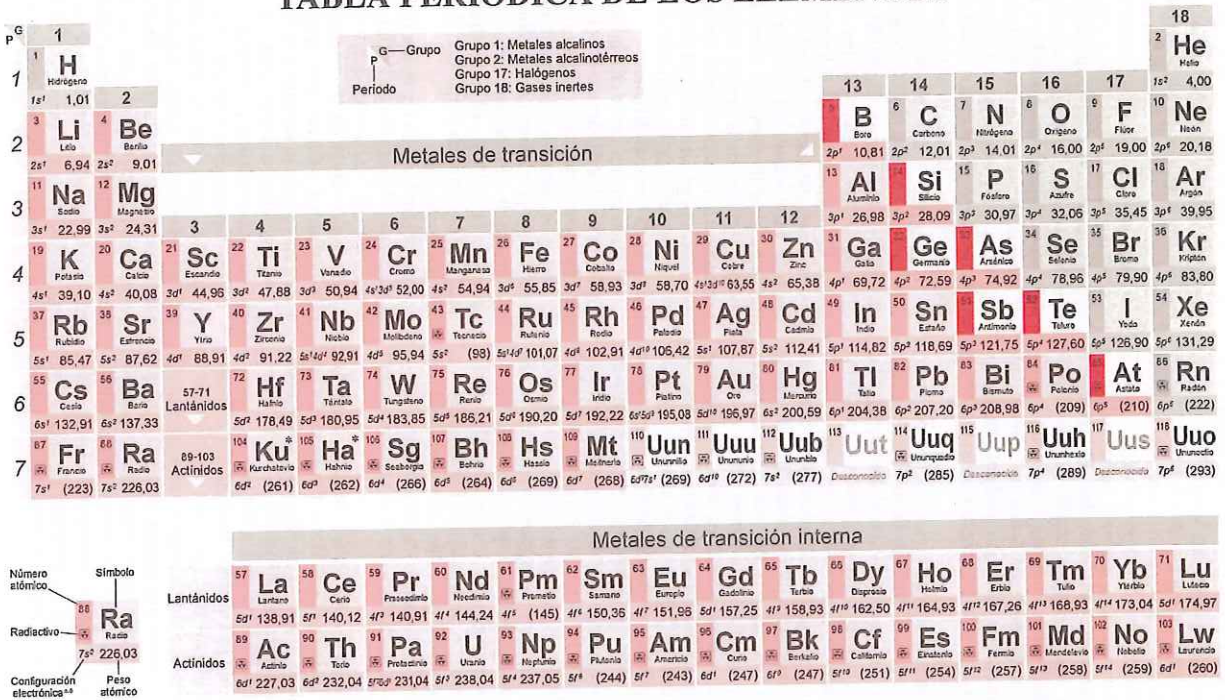
Reduccionismo - Complejidad. Los resultados de la investigación científica permiten disponer en la actualidad de explicaciones satisfactorias acerca de las propiedades y funciones de muchas biomoléculas. La Bioquímica tiene hoy una sólida base experimental, fruto de una concepción *reduccionista* en el estudio e interpretación de los fenómenos. Esta estrategia ha demostrado notable eficiencia en la adquisición de nuevos conocimientos. A partir de los resultados obtenidos con moléculas aisladas y sistemas reconstituidos *in vitro*, se han elaborado modelos que intentan describir la situación *in vivo*. A medida que estos modelos se enriquecen en detalles, se hace más evidente la complejidad de los sistemas biológicos. Paradójicamente, los logros del reduccionismo han puesto de manifiesto sus limitaciones. Resulta ahora indudable que una entidad tan extraordinariamente compleja como un ser vivo no puede definirse por la simple suma de sus componentes. El funcionamiento integrado de esos componentes genera multitud de interacciones y nuevas variables cuyo análisis y comprensión se tornan cada vez más difíciles.

Al igual que en casi todas las áreas del saber, también para los fenómenos biológicos la complejidad ofrece un nuevo escenario de discusión. Es otro gran desafío a la mente humana. Estos desafíos son precisamente el motor de la Ciencia, el estímulo de su incesante búsqueda de explicaciones de la realidad. El fruto cierto de esa búsqueda es la continua expansión de las fronteras del conocimiento.

Importancia de la Química Biológica. Indudablemente, el progreso de la Química Biológica ha sido uno de los factores que más han aportado al desarrollo actual de las Ciencias Biológicas. Las disciplinas médicas, por ejemplo, se han beneficiado significativamente con las contribuciones de esta ciencia y todo indica que ellas serán aún más trascendentes en el futuro.

Esto impone a los biólogos en general, y a los médicos en particular, la responsabilidad ineludible de poseer una sólida preparación en ciencias básicas. En la Química Biológica no sólo encontrarán fundamentos para la interpretación racional de muchos fenómenos fisiológicos y patológicos, sino además el acicate para una actitud inquisitiva, que haga de su actividad una permanente búsqueda de nuevos conocimientos.

TABLA PERIÓDICA DE LOS ELEMENTOS



* El elemento 104 es también llamado ***Rutherfordio*** [Rf] y el 105, ***Dubnio*** [Db].

** En cada elemento se indican sólo el último o los dos últimos subniveles.
El resto de electrones se distribuyen igual que en el elemento precedente,
excepto los NA 59 (Pr) y 65 (Tb) que no poseen $5d^1$, y 94 (Pu) y 97 (Bk) que no poseen $6d^1$.
Números entre paréntesis indican el peso atómico del isótopo más estable o más común.

CAPÍTULO 1

Composición química de los seres vivientes

Elementos biógenos

La vida apareció en la Tierra muchos millones de años después de la formación del planeta. Los elementos básicos de la materia viviente fueron seleccionados entre los existentes en la corteza y atmósfera terrestres.

No todos los elementos que forman parte de la materia inanimada se utilizaron para la estructuración de los seres vivos. Sólo una pequeña proporción de ellos, a los cuales se los denomina elementos biógenos, participan en la composición de organismos vivientes. En mamíferos, animales de gran complejidad, se ha demostrado la presencia de apenas veinte elementos, cuatro de los cuales (oxígeno, carbono, hidrógeno y nitrógeno) representan alrededor del 96% de la masa corporal total (tabla 1-1).

Tabla 1-1. Composición elemental del organismo humano *(expresada en porcentaje de la masa corporal).*

Elementos primarios			
Oxígeno	*65,0 %*	Nitrógeno	*3,0 %*
Carbono	*18,5*	Calcio	*1,5*
Hidrógeno	*10,0*	Fósforo	*1,0*
Elementos secundarios			
Potasio	*0,30 %*	Cloro	*0,15 %*
Azufre	*0,25*	Magnesio	*0,05*
Sodio	*0,20*	Hierro	*0,005*
Oligoelementos			
Flúor	*0,001 %*	Zinc	*Vestigios*
Cobre	*0,0002*	Cobalto	*Vestigios*
Yodo	*0,00004*	Molibdeno	*Vestigios*
Manganeso	*0,00003*	Selenio	*Vestigios*

Con excepción del yodo (número atómico 53), los átomos que intervienen en la constitución del cuerpo humano son miembros de los primeros cuatro períodos de la Tabla Periódica y tienen números atómicos inferiores a 34. De los cuatro elementos más abundantes, el oxígeno es el de número atómico más elevado (8).

A excepción del oxígeno, esos elementos fundamentales no son los predominantes en la corteza terrestre. Esto indica la existencia de ventajas selectivas que los convirtieron en las unidades básicas de la materia viva.

Por ejemplo, pese a la abundancia de silicio en la materia inerte de la corteza terrestre (en ésta el Si representa más del 21% del peso total), la vida se ha desarrollado alrededor de compuestos que tienen al carbono como elemento integrante esencial.

El silicio pertenece al mismo grupo que el carbono y comparte muchas de sus propiedades. Sin embargo, el carbono presenta cualidades distintivas: sus uniones son más estables, puede unirse en largas cadenas y producir ramificaciones, forma enlaces dobles y triples, se asocia covalentemente a muchos otros átomos y adopta distintas conformaciones espaciales. Estas características confieren al carbono un potencial no igualado por elemento alguno para generar multitud de combinaciones diferentes.

La selección de los demás elementos que acompañan al carbono como componentes de la materia viva se explicaría por el tamaño de sus átomos y por su aptitud para compartir electrones en uniones covalentes. La pequeñez atómica aumenta la estabilidad de los enlaces y hace más intensas las interacciones moleculares.

Con un criterio cuantitativo, los elementos bió-enos pueden clasificarse en tres categorías:

1) ***Primarios.*** Estos son oxígeno, carbono, hi-rógeno y nitrógeno. A este grupo suelen agregarse ambién calcio y fósforo. En conjunto, estos seis lementos representan más del 98% de la masa cor-oral total.

Oxígeno e hidrógeno forman la molécula de gua, la sustancia más abundante del organismo. os elementos carbono, oxígeno, hidrógeno, ni-ógeno y fósforo participan en la constitución de is moléculas orgánicas fundamentales de la mate-a viva. El calcio se halla principalmente en tejido seo y, al estado iónico, interviene en muchos pro-esos fisiológicos.

2) ***Secundarios.*** Potasio, azufre, sodio, cloro, agnesio y hierro pertenecen a este grupo. Se en-uentran en cantidades porcentualmente mucho me-ores que las indicadas para los anteriores. Forman ales e iones inorgánicos, e integran moléculas or-ánicas.

El Na^+ y el Cl^- son los principales iones extra-elulares y el K^+ es el principal ion intracelular. l Mg^{2+} es indispensable en numerosas reaccio-es catalizadas por enzimas. El Fe es componente encial de sustancias muy importantes, entre ellas . hemoglobina. El S forma parte de casi todas las oteínas y de otras moléculas de interés biológico.

3) ***Oligoelementos.*** También denominados mi-oconstituyentes, elementos oligodinámicos o stigiales, están presentes en los tejidos en can-dades extremadamente pequeñas en relación con masa total.

El yodo es constituyente de la hormona tiroidea. os otros (F, Cu, Mn, Co, Zn, Mo y Se), aun en ntidades ínfimas, son indispensables para el de-rrollo normal de las funciones vitales. Casi todos n factores necesarios para la actividad de catali-dores biológicos (enzimas).

Compuestos biológicos

Los elementos químicos mencionados se en-entran formando diferentes compuestos de tipo orgánico u orgánico.

Entre los compuestos *inorgánicos*, el agua es de traordinaria importancia, no sólo por su cantidad, . que constituye el 65% del peso corporal de un ulto, sino también por las numerosas funciones e desempeña. En segundo lugar, en términos antitativos, se hallan los sólidos minerales que rticipan en la formación de tejidos duros como esos y dientes. Los compuestos inorgánicos que predominan en estos tejidos son fosfatos de calcio insolubles. El resto de componentes inorgánicos, en su mayor parte, está disuelto en los líquidos corporales y protoplasmas celulares; muchos forman iones esenciales para el mantenimiento de las funciones vitales.

En los compuestos *orgánicos*, el carbono es elemento constituyente obligado. Representan la mayor parte de los sólidos del organismo. A este grupo de sustancias pertenecen compuestos de gran jerarquía funcional, como las proteínas y los ácidos nucleicos. Por su parte, los hidratos de carbono y los lípidos son sustancias de importancia metabólica y estructural, y constituyen el material de reserva energética del organismo.

Existen también otras moléculas, fuera de las mencionadas, que desempeñan importantes funciones, como vitaminas, algunas hormonas y pigmentos. La tabla 1-2 indica la composición porcentual de algunos tejidos humanos. Las cifras representan valores aproximados y solo tienen por objeto dar una idea de la participación de cada uno de los compuestos mencionados en la constitución de los tejidos.

Tabla 1-2. Composición química de tejidos humanos *(las cifras indican porcentaje de la masa de tejido).*

	Músculo	Hueso	Cerebro	Hígado
Agua	*75,0*	*22,0*	*77,0*	*70,0*
Glúcidos	*1,0*	*Escaso*	*0,1*	*5,0*
Lípidos	*3,0*	*Escaso*	*12,0*	*9,0*
Proteínas	*18,0*	*30,0*	*8,0*	*15,0*
Otras sustancias orgánicas	*1,0*	*Escaso*	*1,5*	*1,0*
Otras sustancias inogánicas	*1,0*	*45,0*	*1,0*	*Escaso*

En los capítulos siguientes se consideran estructura y propiedades de los principales grupos de sustancias componentes de la materia viva.

BIBLIOGRAFÍA

de Duve C. (1995). The beginnings of life on Earth. American Scientist, 83: 428-437.

Morowitz H.J. (2002). The Emergence of Everything (How the world became complex), Oxford University Press. Oxford.

CAPÍTULO 2

Agua

El agua es el componente más abundante del organismo humano. Alrededor del 65% de la masa corporal está representado por agua. Los restantes constituyentes de las células y líquidos biológicos se encuentran inmersos en un medio acuoso que condiciona sus propiedades y comportamiento. No existe proceso vital alguno que pueda concebirse independientemente de la participación directa o indirecta del agua.

Esta sustancia posee propiedades excepcionales. Por ejemplo, su temperatura de fusión (0°C), de ebullición (100°C) y calor de vaporización (40,71 kJ/mol) son notablemente elevados si se los compara con los de otros compuestos de masa molecular similar. Estas y otras características un tanto "aberrantes" del agua se explican por su estructura molecular.

En el agua (H_2O), el oxígeno está unido, mediante enlaces covalentes simples, a dos átomos de hidrógeno. Como el oxígeno es más electronegativo que el hidrógeno, el par de electrones compartido en cada uno de los enlaces está desplazado hacia el núcleo del oxígeno. Se crea una carga parcial electronegativa en la vecindad del núcleo del O y otra electropositiva alrededor del núcleo del H, reducido casi a un protón "desnudo". Individualmente, los enlaces son de carácter polar (covalente polar).

La molécula de agua es polar

Si los tres átomos que componen la molécula estuviesen dispuestos en línea recta (H–O–H), la resultante o "centro de gravedad" de las cargas positivas estaría situado en el centro de la molécula, coincidiendo con la carga negativa. La molécula resultaría apolar, como sucede en otros compuestos que poseen enlaces covalentes polares, como el dióxido de carbono (CO_2) o el tetracloruro de carbono (CCl_4) por ejemplo.

Se ha determinado que en la molécula de agua los dos enlaces O–H no se encuentran en línea, sino formando un ángulo de 104,5° entre sí (figs. 2-1 y 2-2). La carga negativa se encuentra alrededor del vértice de la molécula, mientras la resultante de las cargas positivas puede concebirse ubicada en el punto medio de la línea que une los dos núcleos de hidrógeno. Se forma así un *dipolo* y la molécula, si bien en conjunto es eléctricamente neutra, resulta polar (fig. 2-3).

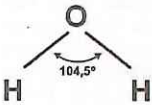


Fig. 2-1. Disposición de los átomos en la molécula de agua.

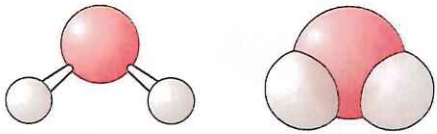


Fig. 2-2. Modelos moleculares del agua. A la izquierda se muestra un modelo de esferas y varillas; a la derecha, un modelo espacial lleno. En rojo, el átomo de oxígeno.

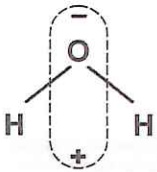


Fig. 2-3. Distribución de las cargas eléctricas en la molécula de agua.

La polaridad de las moléculas de agua permite que ellas puedan atraerse electrostáticamente entre sí. La carga parcial positiva de un hidrógeno en una molécula es atraída por la carga parcial negativa del oxígeno de otra molécula, estableciéndose así un *puente de hidrógeno* (fig. 2-4).

Puente de hidrógeno

La unión "puente de hidrógeno" que se forma entre moléculas de agua no es privativa de éstas. Existe también en otros compuestos, algunos de gran importancia biológica, como se verá más adelante.

El puente de hidrógeno se forma fácilmente entre un átomo electronegativo (comúnmente O o N) y un átomo de hidrógeno unido covalentemente a otro átomo electronegativo. La unión es más estable cuando los tres elementos interesados en ella, es decir, los dos átomos electronegativos y el H intermedio, están colocados en la misma línea (fig. 2-4).

Este tipo de unión permite la interacción de las moléculas de agua y explica las "anomalías" en las propiedades de esta sustancia. En realidad, su comportamiento no corresponde al que se esperaría de un compuesto con la fórmula H_2O, sino al de complejos poliméricos $(H_2O)_n$, que se forman en el agua, especialmente en sus estados sólido y líquido.

El carácter direccional del enlace de H determina ciertas relaciones geométricas en las asociaciones polimoleculares del agua. Se puede concebir a la molécula de agua como inscripta en un tetraedro, con el átomo de oxígeno en el centro. Los enlaces O–H se dirigen hacia dos de los vértices del tetraedro y los electrones no compartidos que le restan al oxígeno, situados en orbitales híbridos sp^3, están orientados hacia los otros dos vértices del tetraedro (fig. 2-5). Debido a esta disposición tetraédrica, cada molécula de agua puede formar puentes de hidrógeno con otras cuatro (fig. 2-6).

En realidad, en un tetraedro regular el ángulo entre pares de electrones sería de 109,5°. En la molécula de agua, los dos pares de electrones de las uniones covalentes son rechazados por los pares de electrones no covalentes, que se encuentran más cerca del átomo de oxígeno y provocan una ligera distorsión del tetraedro que resulta en una angulación de 104,5° entre las uniones O–H.

En el agua sólida (hielo) las moléculas se disponen de esta manera, originando un conjunto ordenado en una trama cristalina regular. Las moléculas se mantienen a distancias fijas entre sí, determinadas por la longitud de los enlaces. Las que no están unidas por puentes de H pueden aproximarse hasta una distancia de 0,45 nm. La red cristalina del hielo presenta relativamente más espacio vacío que el agua líquida, en la cual las moléculas no asociadas por enlaces H poseen más libertad y pueden acercarse. Esto explica por qué el hielo es menos denso que el agua líquida.

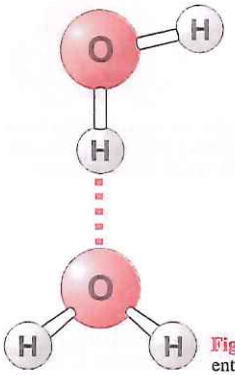


Fig. 2-4. Puente de hidrógeno entre dos moléculas de agua.

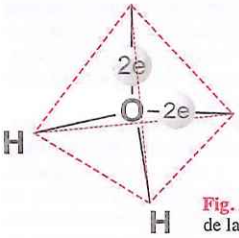


Fig. 2-5. Geometría tetraédrica de la molécula de agua.

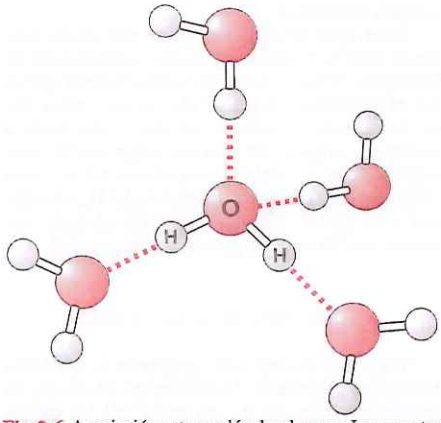


Fig. 2-6. Asociación entre moléculas de agua. Los puentes de hidrógeno, indicados en rojo, siguen la disposición tetraédrica.

En el agua líquida se pierde ese alto grado de ordenamiento, pues aunque las moléculas siguen asociadas (se calcula que, término medio, cada molécula está unida a otras 3,4), los puentes de hidrógeno son muy inestables; se forman y se rompen con gran rapidez, razón por la cual se dice que los agrupamientos moleculares son "fluctuantes" u "oscilantes". Esta red dinámica que forman las moléculas de agua unidas por puentes de H explica los valores elevados de calor de vaporización y temperatura de ebullición. Se requiere una cantidad muy grande de energía para vencer esas atracciones intermoleculares, que no existen en otras sustancias de masa molecular parecida.

Las uniones H explican también la elevada tensión superficial del agua y su alta viscosidad comparadas con las de la mayoría de líquidos orgánicos. Sin embargo, debido a la fluctuación permanente de los puentes de H en el agua líquida, ésta presenta mayor fluidez, es decir menor viscosidad, que la correspondiente a moléculas poliméricas.

El agua como solvente

El carácter polar de las moléculas de agua es responsable de interacciones con otras sustancias que entren en relación con ellas. Lógicamente, estas interacciones dependen de la naturaleza de la otra sustancia.

1) *Compuestos iónicos*. En general, las sustancias iónicas son solubles en agua. En cristales de este tipo de compuestos (ej. NaCl), las atracciones electrostáticas entre los iones constituyentes (Na^+ y Cl^-) mantienen una red altamente ordenada. Cuando estos cristales se ponen en contacto con agua, se produce una alteración en la organización de las moléculas de ambos compuestos. Las moléculas dipolares del agua son atraídas por los iones con fuerza suficiente como para disociarlas de sus uniones. Los iones se van rodeando de moléculas de agua, lo cual debilita la fuerza de atracción con los iones de carga contraria en el cristal y terminan por separarse y dispersarse en el solvente. Los iones en solución acuosa se encuentran hidratados, esto es, rodeados por una capa o "aureola" de moléculas de agua. Los cationes (por ej. Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} entre los inorgánicos; grupos amina $\equiv C–NH_3^+$ entre los orgánicos) atraen la zona de carga parcial negativa de la molécula de agua. Los aniones (por ej. Cl^-, HPO_4^{2-}, HCO_3^-, entre los inorgánicos; grupos carboxilato $–COO^-$ entre los orgánicos) atraen la zona de carga positiva del dipolo (fig. 2-7).

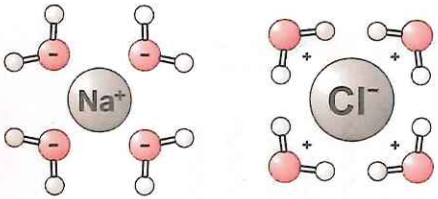


Fig. 2-7. Interacción de iones con el solvente agua. A la izquierda, ion Na^+ hidratado; a la derecha, ion Cl^- hidratado.

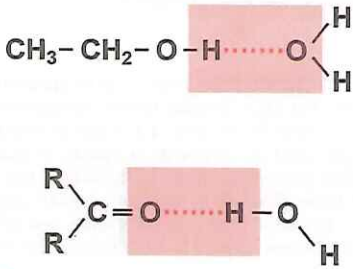


Fig. 2-8. Formación de puentes de hidrógeno (línea de puntos en rojo) entre agua y un alcohol (arriba) y entre agua y una cetona (abajo).

2) *Compuestos polares no iónicos*. En el caso de alcoholes, aldehídos o cetonas, por ejemplo, el agua puede formar puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilos o carbonilos presentes en esas moléculas (fig. 2-8), lo cual facilita su disolución.

Los compuestos iónicos y polares no iónicos, en general, son *hidrófilos* pues pueden interaccionar con las moléculas de agua y formar soluciones estables.

3) *Compuestos apolares*. Este tipo de sustancias, como los hidrocarburos por ejemplo, resultan prácticamente insolubles en agua, pues no puede establecerse unión o atracción entre sus moléculas y las de agua. Se las llama sustancias *hidrófobas*, generalmente se disuelven bien en solventes orgánicos no polares o poco polares (ej. benceno, tetracloruro de carbono, cloroformo). Las moléculas apolares pueden ejercer entre sí atracciones de un tipo denominado *interacciones hidrofóbicas*.

4) *Compuestos anfipáticos*. Existen sustancias que poseen grupos hidrófobos e hidrófilos en la misma molécula, por ejemplo, los fosfolípidos o las sales de ácidos grasos de cadena larga con metales monovalentes (jabones de Na o K). Este tipo de sustancias son denominadas *anfifílicas* o *anfipáticas*. En contacto con agua se colocan con su porción hidrofílica dirigida hacia la superficie del agua o sumergida en ella, mientras el resto apolar se proyecta hacia el exterior de la fase acuosa (fig.

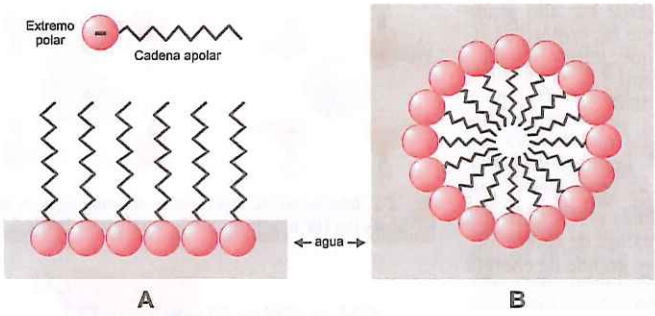


Fig. 2-9. Esquema de una molécula anfifílica o anfipática (arriba izquierda). **A.** Disposición de moléculas anfipáticas en la interfase agua-aire. **B.** Micela de moléculas anfipáticas en el seno del agua.

2-9 A). Cuando estas moléculas se encuentran en el seno del agua, pueden formar agrupaciones esféricas llamadas *micelas*. Las cadenas apolares se dirigen hacia el interior de la micela, mutuamente atraídas por interacciones hidrofóbicas. Los extremos hidrofílicos de la molécula quedan expuestos hacia la fase acuosa e interaccionan con ella (fig. 2-9 B), lo cual asegura la estabilidad de las micelas.

El agua como electrólito

Se llaman electrólitos las sustancias que en solución acuosa se disocian en partículas con carga eléctrica o *iones*. Estas soluciones tienen la propiedad de permitir el paso de corriente eléctrica.

Si se preparan soluciones de igual molaridad de diferentes electrólitos, se las somete a la acción del mismo potencial eléctrico y se mide la intensidad de la corriente que atraviesa cada una de las soluciones, puede comprobarse que algunas de ellas son excelentes conductores, mientras otras conducen muy pobremente la corriente eléctrica. De acuerdo con este criterio, se puede dividir a los electrólitos en *fuertes* y *débiles*.

Por ejemplo, una solución de HCl 1 M es mucho mejor conductora que una de ácido acético (CH_3–COOH) 1 M. Esto indica que en la solución de HCl debe haber mayor número de iones que en la de ácido acético, ya que cuanto mayor sea la cantidad de iones disponibles para transportar la corriente eléctrica, mayor será la conductividad.

Ambas soluciones se prepararon disolviendo el mismo número de moléculas por litro (1 mol de sustancia o $6{,}022 \cdot 10^{23}$ moléculas); por lo tanto, la mayor conductividad de la solución de HCl prueba que éste se ha ionizado en mayor proporción que el ácido acético. El primero es un electrólito fuerte, mientras en el segundo, un electrólito débil, sólo una pequeña parte del total de moléculas disueltas se separa en iones.

Constante de equilibrio

El proceso de ionización puede asimilarse a una reacción química, la cual se presenta como una reacción reversible en el caso de los electrólitos débiles. En los electrólitos fuertes, se considera que prácticamente todas las moléculas se dividen en iones y la reacción transcurre en un solo sentido:

$$HCl \rightarrow H^+ + Cl^-$$

Si designamos AB a la molécula de un electrólito débil que se ioniza parcialmente en iones A^+ y B^-, la notación será:

$$AB \rightleftharpoons A^+ + B^-$$

La reacción de separación de la molécula AB en iones prosigue hasta cierto límite, en el cual coexisten en la solución moléculas enteras e iones, cuyas cantidades relativas ya no cambian más. Se dice que se ha alcanzado un *equilibrio*.

Los valores de concentración de los iones y de las moléculas enteras en el equilibrio dependen de la naturaleza del electrólito, de la concentración inicial de sustancia y de la temperatura. Para un sistema en equilibrio químico, a una determinada temperatura, existe una relación numérica constante entre sus componentes, relación que se satisface siempre, independientemente de las concentraciones iniciales de sustancia. Esta relación es la *constante de equilibrio* (K_{eq}), representada por la ecuación:

$$K_{eq} = \frac{[A^+][B^-]}{[AB]}$$

(Los corchetes se utilizan para indicar concentración. $[A^+]$, $[B^-]$ y [AB] significan concentraciones de A^+, B^- y AB respectivamente).

El equilibrio es dinámico; constantemente moléculas se ionizan y se recombinan para formar

moléculas. En equilibrio, ambos procesos ocurren a igual velocidad, razón por la cual las concentraciones de cada uno de los integrantes del sistema permanecen invariables.

En la reacción de ionización del electrólito débil AB:

$$AB \underset{2}{\overset{1}{\rightleftharpoons}} A^+ + B^-$$

La velocidad (V_1) con la cual transcurre la reacción de ionización (reacción 1), será igual a:

$$V_1 = k_1 [AB]$$

Donde k_1 es un valor constante, característico para cada sustancia a una temperatura dada y [AB] es la concentración molal de AB.

Para la reacción inversa (reacción 2), la velocidad V_2 con la cual A^+ y B^- se asocian para formar AB es:

$$V_2 = k_2 [A^+] [B^-]$$

En estado de equilibrio, las velocidades de la reacción directa e inversa son iguales ($V_1 = V_2$), por lo tanto:

$$k_1 [AB] = k_2 [A^+] [B^-]$$

de donde:

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{[A^+][B^-]}{[AB]}$$

k_1/k_2 es un cociente entre dos constantes; por lo tanto es otra constante, a la que se designa K o K_{eq}.

Luego:

$$K_{eq} = \frac{[A^+][B^-]}{[AB]}$$

El valor numérico de esta constante en un electrólito da idea de su grado de ionización. Cuanto menor sea K_{eq} más débil será el electrólito. Una K_{eq} de valor próximo a la unidad indica que el electrólito está extremadamente disociado. Cuando K_{eq} tiene un valor de alrededor de 10, el electrólito está prácticamente ionizado en forma total. En los sistemas biológicos, se puede considerar fuerte un electrólito cuando su K_{eq} es mayor de 0,0001 o 10^{-4}.* Si K_{eq} es menor de 10^{-14}, se puede afirmar que la sustancia no es un electrólito. Los electrólitos débiles tienen valores de K_{eq} intermedios entre los citados.

* La escritura de números muy pequeños puede simplificarse mediante el uso de potencias de base 10 con exponente negativo.

Cuando se conoce la constante de ionización de un electrólito, se puede calcular con bastante aproximación la concentración de cada uno de los iones y la de moléculas enteras en una solución, siempre que se conozca también la concentración inicial de sustancia.

Equilibrio de ionización del agua

El agua se ioniza muy débilmente generando iones hidrógeno o protones e iones hidróxido, según la reacción:

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$$

La representación del ion H^+ como una entidad independiente no es correcta. El protón rápidamente reacciona con moléculas de agua. Tratando de dar una versión más exacta del estado del H^+, muchos autores se refieren al ion *hidronio* (H_3O^+) resultante de la unión del protón a una molécula de agua. En realidad, es más correcta la notación $[H(H_2O)_n]^+$. A los fines prácticos, seguiremos utilizando H^+, pero advirtiendo que se trata sólo de un símbolo, sin existencia independiente.

La constante de ionización del agua se expresa por la ecuación:

$$K_{eq} = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}$$

Se ha determinado el valor de K_{eq} por medición de la conductividad eléctrica del agua pura. Si se conoce la conductividad de los iones, es posible calcular la concentración de los mismos en el agua. En el agua pura a 25°C, la $[H^+]$ es 0,0000001 o 10^{-7} M; por supuesto, la $[OH^-]$ es igual, ya que al ionizarse el agua genera el mismo número de OH^- que de H^+.

El valor de K_{eq} para el agua pura es muy pequeño y varía con la temperatura. Por ejemplo, es $1{,}8 \cdot 10^{-16}$ M a 25°C y $4{,}3 \cdot 10^{-16}$ M a 37°C. De acuerdo con estas cifras, el agua no debería ser considerada un electrólito. Sin embargo, pese a su minúscula magnitud, esta constante de ionización tiene una enorme importancia en biología. En las secciones siguientes se considerará con algún detalle este tema y el de la concentración de los iones del agua.

El lector podrá preguntarse por qué se dedica tanta atención al H^+ generado por la ionización del agua, cuando su concentración es de una magnitud al parecer despreciable. Resulta que las variaciones de $[H^+]$, aún minúsculas, suelen tener efectos muy notables en los sistemas biológicos.

Los iones hidrógeno son muy pequeños (están constituidos por un protón) y poseen, comparativamente con otros iones, una gran densidad de carga, que crea gradientes eléctricos significativos a su alrededor. Por esta razón pueden influir marcadamente, por ejemplo, sobre puentes de hidrógeno que contribuyen a mantener la estructura y conformación de macromoléculas de importancia biológica, o sobre el estado de ionización de grupos funcionales críticos para el comportamiento de ciertas moléculas.

Como la masa molecular del agua es 18 daltons (1 mol de agua = 18 g), la concentración molal de agua en el agua pura es mayor de 55,5 (en 1.000 g de agua hay 1.000/18 = 55,55555... moles). De los 55,5 moles, sólo 0,0000001 mol se encuentra ionizado, es decir, sólo una molécula cada 555,5 millones se separa en iones. Si en la ecuación de la constante de ionización del agua se traspone el término $[H_2O]$, se tiene:

$$K_{eq}\,[H_2O] = [H^+]\,[OH^-]$$

La cantidad de moléculas ionizadas es insignificante en relación con el total, razón por la cual puede considerarse, sin cometer error apreciable, que el proceso de ionización no modifica la concentración de moléculas enteras $[H_2O]$, la cual se mantiene prácticamente constante. En la ecuación anterior tenemos el producto de una constante (K_{eq}) por otra $[H_2O]$, que resulta en una nueva constante, designada K_w:

$$K_{eq}\,[H_2O] = K_w \;\therefore\; K_w = [H^+]\,[OH^-]$$

La constante K_w es designada *producto iónico* del agua, su valor a 25°C es:

$$K_w = [H^+]\,[OH^-] = 0{,}0000001 \times 0{,}0000001 = 10^{-7} \times 10^{-7} = 10^{-14}$$

En el agua pura $[H^+] = [OH^-]$, de modo que en la ecuación puede sustituirse $[OH^-]$ por $[H^+]$ o viceversa:

$$K_w = [H^+][H^+] \;\therefore\; [H^+] = \sqrt{K_w}$$

$$\text{o}\quad K_w = [OH^-][OH^-] \;\therefore\; [OH^-] = \sqrt{K_w}$$

El valor de K_w es constante tanto en el agua pura como en cualquier solución acuosa. Todo aumento en la concentración de uno de los dos iones del agua ocasionará una disminución inmediata en la concentración del otro ion por desplazamiento del equilibrio hacia la formación de moléculas enteras y el producto iónico permanecerá invariable. Si, por ejemplo, se disuelve en agua un soluto electrolítico capaz de ionizarse dando iones hidrógeno, como el HCl por ejemplo ($HCl \rightarrow H^+ + Cl^-$), la concentración de H^+ será mayor en esta solución que en el agua pura. El valor del producto iónico tenderá a restablecerse por el aumento de la velocidad de la reacción de asociación de iones H^+ e OH^- para formar moléculas enteras. En consecuencia, la concentración de iones OH^- disminuirá hasta alcanzar el equilibrio cuando el valor de K_w sea 10^{-14} (a 25°C). Así, si al agregar HCl la concentración de H^+ aumenta a 10^{-1} M (1 millón de veces superior a la del agua pura a 25°C), la de iones OH^- tendrá que reducirse a un valor de 10^{-13} (un millón de veces menor que la del agua pura). El producto iónico se mantendrá constante:

$$K_w = 10^{-1} \cdot 10^{-13} = 10^{-14}$$

Análogo reajuste en la concentración de iones H^+ se producirá si se disuelven en agua electrólitos que aumenten la concentración de OH^- (ej. $NaOH \rightarrow Na^+ + OH^-$). Como consecuencia del incremento de $[OH^-]$ se producirá una disminución en la concentración de H^+ por formación de moléculas enteras (H_2O) en cantidad suficiente para mantener el valor de K_w.

Ácidos y bases

Una solución es *neutra* cuando su concentración de iones hidrógeno es igual a la de iones hidróxido. El agua pura es neutra porque en ella $[H^+] = [OH^-]$. El valor $1 \cdot 10^{-7}$ M para $[H^+]$ o $[OH^-]$ en el agua pura es el correspondiente a 25°C y varía notablemente con la temperatura ($[H^+]$ o $[OH^-] = 3{,}4 \cdot 10^{-8}$ a 0°C y $8{,}8 \cdot 10^{-7}$ a 100°C).

Cuando en una solución la concentración de iones hidrógeno es mayor que la de iones hidróxido, se dice que es *ácida*. En cambio, se llama *básica* o *alcalina* a la solución cuya concentración de iones hidrógeno es menor que la de iones hidróxido.

Estos conceptos nos permiten adelantar definiciones prácticas de ácidos y bases:

Ácidos son sustancias que, al ser disueltas en agua o soluciones acuosas, producen aumento de la concentración de hidrogeniones.

Bases o *álcalis* son sustancias que, al ser disueltas en agua o soluciones acuosas, producen disminución de la concentración de hidrogeniones.

Según Bronsted y Lowry, ácidos son todos los compuestos o iones capaces de ceder protones

(H^+) al medio y bases son los que pueden aceptar protones del medio.

Aquí la definición se ha extendido a iones, por ej. HSO_4^- y NH_4^+, que pueden ceder un ion H^+ en solución. En cuanto a las bases, es usual considerar a los hidróxidos de metales alcalinos como bases típicas (por ej., NaOH), pero estrictamente, según Bronsted y Lowry, la base es el ion OH^- que esas sustancias liberan en solución. Es el OH^- el que puede tomar un H^+ de la solución y formar agua. Asimismo todos los iones que pueden captar H^+, como CO_3^{2-} o Cl^-, son bases.

Cuando una molécula o anión puede tomar un H^+ (base de Bronsted-Lowry), se forma su "ácido conjugado". Ej.:

Base		*Protón*		*Ácido conjugado*
OH^-	+	H^+	→	H_2O
NH_3	+	H^+	→	NH_4^+
CO_3^{2-}	+	H^+	→	HCO_3^-

Cuando un ácido pierde un hidrogenión, se forma su "base conjugada". Ej.:

Ácido		*Protón*		*Base conjugada*
HCl	→	H^+	+	Cl^-
H_2SO_4	→	H^+	+	HSO_4^-
HNO_3	→	H^+	+	NO_3^-

Fuerza de ácidos y bases

La fuerza de un ácido o la de una base está determinada por su tendencia a perder o a ganar protones. Como electrólitos que son, los ácidos pueden dividirse en *fuertes* (HCl, H_2SO_4, HNO_3) y *débiles* ($H_2PO_4^-$, CH_3COOH, H_2CO_3). Las moléculas de los primeros se ionizan en forma prácticamente total al ser disueltos en agua. Los segundos sólo ionizan una pequeña proporción de sus moléculas. De aquí que, para una misma concentración de ácido, la concentración de iones hidrógeno sea mayor en las soluciones de ácidos fuertes que en las de débiles.

La capacidad de un ácido para perder protones (fuerza ácida) se expresa por su constante de ionización (K_a). Si llamamos HA al ácido:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

Mientras mayor sea el valor de K_a más fácilmente el ácido cederá protones. En general, las K_a de los ácidos fuertes alcanzan valores tan grandes (10^2 a 10^{10}), que para los fines prácticos tienen poco significado. Se considera por ello que cualquier ácido fuerte está totalmente ionizado en soluciones acuosas diluidas.

Los ácidos débiles, por el contrario, se ionizan parcialmente y el valor numérico de la constante K_a es muy pequeño.

Las bases también pueden dividirse en fuertes (NaOH, KOH, $Ca(OH)_2$, etc.) y débiles (NH_3, trimetilamina, anilina, etc.). Las primeras se disocian completamente en solución. Al igual que para ácidos débiles, las constantes de ionización de las bases débiles (K_b) reflejan el grado de ionización.

Una generalización útil acerca de las fuerzas relativas de los pares ácido-base es: si un ácido es fuerte, su base conjugada es débil; si una sustancia es una base fuerte, su ácido conjugado es débil.

Concepto de pH

Como el producto iónico del agua $[H^+][OH^-]$ tiene una magnitud constante a una determinada temperatura, basta conocer la concentración de uno de los iones para deducir la del otro; no es necesario indicar la de ambos. En la práctica, se ha difundido la costumbre de hacer referencia a la concentración del ion hidrógeno. El manejo de magnitudes tan pequeñas como las que alcanza la $[H^+]$ resulta engorroso, razón por la cual se procuró siempre buscar formas más simples de expresión. Con ese propósito, el bioquímico danés Sørensen propuso en 1909 la notación pH, que tuvo amplia aceptación y es la forma más comúnmente utilizada para indicar la concentración de iones hidrógeno.

Para obtener el valor de pH se realiza una doble transformación del valor de $[H^+]$. Primero se toma la inversa de la concentración de H^+ y, luego, el logaritmo de base 10 de esa inversa.

Entonces, se puede definir el pH como el logaritmo de la inversa de la concentración de iones hidrógeno o, en otros términos, el logaritmo negativo de la concentración de H^+.

$$pH = \log\frac{1}{[H^+]} = -\log[H^+]$$

En el caso del agua pura a 25°C $[H^+] = [OH^-] = 10^{-7}$ M, por lo tanto:

$$pH = \log\frac{1}{[H^+]} = \log\frac{1}{10^{-7}} = \log 10^7 = 7$$

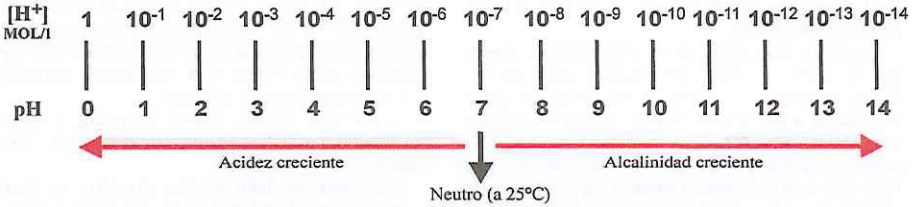


Fig. 2-10. Correspondencia entre valores de $[H^+]$ y de pH.

La misma notación puede ser usada para otras cantidades como $[OH^-]$, K_w, K_a; se tendrá entonces pOH, pK_w, pK_a, etc.

$$pOH = \log\frac{1}{[OH^-]} \qquad pK_a = \log\frac{1}{K_a}$$

Es conveniente tener presente las siguientes características de la notación pH:

a) No hay relación directa entre las magnitudes de $[H^+]$ y de pH. Cuando el valor de $[H^+]$ aumenta, el de pH disminuye y viceversa. Además, la escala de pH es logarítmica (no aritmética como la de $[H^+]$); todo aumento o disminución de una unidad en el pH indica un cambio de 10 veces en la $[H^+]$, dos unidades de pH corresponden a 100 de $[H^+]$, tres a 1000, etc. (fig. 2-10).

b) Un pH igual a 7 sólo indica neutralidad a 25°C. Como la $[H^+]$ cambia con la temperatura, también lo hace el valor de pH. El agua pura (neutra) tiene un pH de 7,5 a 0°C y de 6,1 a 100°C. A la temperatura del cuerpo humano, 37°C, el pH neutro es 6,8.

c) Habitualmente se dice que el pH de una solución puede variar entre 0 y 14 como valores límite. Este rango cubre prácticamente la totalidad de los casos que tendremos ocasión de tratar. Por ejemplo, los valores de pH de 0 a 14 abarcan el rango de concentraciones de H^+ que van desde la de una solución 1 M de un ácido fuerte (pH = 0) en un extremo, hasta la de una solución 1 M de una base fuerte (pH = 14) en el otro. Sin embargo, teóricamente la escala puede extenderse más allá de esos límites. Al parecer, los valores de $[H^+]$ extremos que pueden obtenerse en soluciones acuosas son 10^{-15} y 15 M, que corresponden a pH 15 y −1,2 respectivamente.

Soluciones amortiguadoras

Soluciones amortiguadoras, *buffers* o *"tampones"* son aquellas que reducen los cambios en la concentración de iones hidrógeno que podría producirles el agregado de pequeñas cantidades de electrólito ácido o alcalino. En otros términos, frenan las desviaciones del pH que la adición de un ácido o una base ocasionaría en el medio.

En general, una solución amortiguadora (también llamada *sistema amortiguador*) está constituida por una mezcla de un electrólito débil (ácido o básico) y una sal del mismo que actúa como electrólito fuerte. Ejemplos:

Ácido carbónico – Bicarbonato de sodio
H_2CO_3 / $NaHCO_3$

Ácido acético – Acetato de sodio
CH_3–COOH / CH_3–COONa

Fosfato monosódico – Fosfato disódico
NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4

Amoníaco – Cloruro de amonio
NH_3 / NH_4Cl

Mecanismo de la acción amortiguadora de un *buffer*. Si se prepara una solución de ácido carbónico, éste ioniza en bicarbonato (HCO_3^-) e hidrógeno (H^+), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

La constante de ionización del ácido (K_a) estará dada por la relación:

$$K_a = \frac{[HCO_3^-][H^+]}{[H_2CO_3]}$$

Por tratarse de un electrólito débil, en la situación de equilibrio el número de iones es muy escaso comparado con el de moléculas enteras. Si a esta solución se le agrega una sal del mismo ácido, se constituye un sistema *buffer* o amortiguador. La sal sódica, por ejemplo, es un electrólito fuerte que se disocia totalmente en anión bicarbonato y catión sodio:

$$NaHCO_3 \rightarrow HCO_3^- + Na^+$$

Puede advertirse que los dos componentes del sistema originan ion bicarbonato al disociarse; ambos poseen un ion en común.

Como la adición de la sal produce un incremento en la concentración del ion HCO_3^- en la solución y el valor de la K_a del ácido debe mantenerse, hay un desplazamiento del equilibrio de ionización del ácido carbónico hacia la formación de moléculas enteras (*efecto del ion común*), por lo cual disminuye la ionización del H_2CO_3, al punto que prácticamente puede considerarse a todo el ácido al estado no ionizado. Se genera así una nueva situación de equilibrio, caracterizada por la alta concentración de iones bicarbonato y de moléculas enteras de ácido y por la escasa concentración de iones hidrógeno.

Si a esta solución se le agrega un ácido fuerte (HCl, por ej.), el aumento en la concentración de iones hidrógeno que el mismo provoca, desplaza el equilibrio hacia la formación de moléculas enteras de ácido carbónico, con lo cual la concentración de éstas aumenta y la de iones bicarbonato disminuye.

$$HCl + HCO_3^- \rightarrow H_2CO_3 + Cl^-$$

En otros términos, gran parte de los iones hidrógeno procedentes del ácido clorhídrico son fijados por el ion bicarbonato, dando ácido carbónico no ionizado. Por lo tanto, el aumento en la concentración de iones hidrógeno en la solución es muy escaso y el pH casi no se modifica.

Si, en cambio, al sistema *buffer* se le adiciona una base (NaOH, por ej.), se generan iones OH^- que son fijados por los iones hidrógeno de la solución para dar agua. Ello provoca un desplazamiento del equilibrio de ionización del ácido carbónico hacia la derecha, generando nuevos iones hidrógeno que se combinan con OH^-:

$$NaOH + H_2CO_3 \rightarrow HCO_3^- + Na^+ + H_2O$$

En consecuencia, el aumento en la concentración de iones OH^- en la solución es escaso y, por consiguiente, el pH sólo se altera levemente.

pH de las soluciones amortiguadoras. En un sistema constituido por un ácido débil y su sal, es posible calcular el pH a partir de la constante de ionización del ácido y de las concentraciones iniciales del ácido y de la sal.

Supongamos un *buffer* formado por el ácido débil HA y su sal, NaA. El ácido débil se ioniza de acuerdo con la ecuación:

$$HA \rightleftharpoons A^- + H^+$$

Su K_a será: $$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]}$$

La sal se comporta como electrólito fuerte y se disociará de acuerdo con la ecuación:

$$NaA \rightarrow A^- + Na^+$$

Por tratarse de un electrólito fuerte, se disocia totalmente, de manera que en la solución la concentración de iones negativos A^- y la concentración de iones Na^+ serán iguales a la concentración inicial de la sal.

Como el ion A^- es común al ácido y a la sal, la alta concentración del mismo en la solución (procedente de la ionización total de la sal) provoca un desplazamiento del equilibrio de ionización del ácido hacia la formación de moléculas enteras. En la mayoría de los casos, esta situación hace que prácticamente todo el ácido quede no ionizado y la concentración de moléculas enteras de ácido puede considerarse igual a la concentración inicial del mismo.

En la ecuación de equilibrio de ionización del ácido, podemos reemplazar la concentración de ion A^- por la concentración inicial de la sal y la concentración de moléculas enteras HA, por la concentración inicial del ácido:

$$K_a = \frac{[sal][H^+]}{[ácido]}$$

despejando $[H^+]$:

$$[H^+] = \frac{[ácido]}{[sal]} \cdot K_a$$

tomando logaritmo de la inversa:

$$\log \frac{1}{[H^+]} = \log \frac{[sal]}{[ácido]} + \log \frac{1}{K_a}$$

Como $\log 1/[H^+] = pH$ y $\log 1/K_a = pK_a$, se tiene:

$$pH = pK_a + \log \frac{[sal]}{[ácido]}$$

El pH de una mezcla amortiguadora es igual al pK del ácido (pK_a) más el logaritmo del cociente entre la concentración inicial de la sal y la concentración inicial del ácido. Esta ecuación es conocida como *ecuación de Henderson-Hasselbalch*.

La capacidad amortiguadora de un sistema *buffer* frente a ácidos o bases varía según las con-

centraciones relativas del ácido con respecto a las de la sal en el sistema. Es máxima cuando la concentración del ácido es igual a la de la sal. En este caso, el cociente [sal] / [ácido] es igual a 1 y, como logaritmo de 1 es igual a cero, de acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbalch, el pH es igual al pK_a.

La afirmación anterior podría ser reformulada del siguiente modo: la capacidad de un sistema amortiguador para frenar los cambios de pH producidos en el medio por la adición de ácidos o bases, es máxima cuando el pH del *buffer* es igual al pK_a del ácido componente del mismo.

Curva de titulación de ácidos y bases

La titulación ácido-base es un procedimiento que permite determinar la concentración o "título" de una solución ácida (o básica) por la adición de una cantidad medida y equivalente de una solución básica (o ácida). Sea una solución ácida o básica de la cual se parte inicialmente, la titulación implica una reacción de neutralización. Cuando se combina igual número de equivalentes de ácido y de base, se está en el punto de equivalencia.

A medida que transcurre la reacción se producen cambios progresivos en el pH del medio y cuando se llega al punto de equivalencia, una pequeña cantidad adicional de ácido o base causa un cambio rápido y marcado de pH. Los valores de pH en cada paso de la titulación se determinan mediante métodos potenciométricos.

La marcha de este proceso de neutralización puede representarse mediante las llamadas curvas de titulación, en las cuales se indican los cambios producidos en el pH en función del volumen de solución ácida o básica de concentración conocida que se agrega. Los valores de pH se indican sobre el eje de ordenadas y los volúmenes de ácido o base añadidos, sobre el de abscisas (fig. 2-11). En el curso de la valoración de un ácido o una base débil por una base o ácido fuerte, se forma en el medio un sistema *buffer*, la concentración de cuyos componentes va cambiando a medida que avanza la titulación. Los cambios de pH que se producen en las distintas etapas de la neutralización aportan datos de interés relacionados con la capacidad amortiguadora del sistema.

Analizaremos a continuación una curva de titulación de un ácido débil, tomando como ejemplo la neutralización de 10 mL de ácido acético 0,1 N mediante el agregado de solución de NaOH 0,1 N.

El ácido acético se ioniza débilmente, dando iones H^+ y acetato (CH_3COO^-):

$$CH_3COOH \rightleftharpoons H^+ + CH_3COO^-$$

La constante de ionización del ácido estará representada por la relación:

$$K_a = \frac{[H^+][CH_3COO^-]}{[CH_3COOH]}$$

El valor de K_a del ácido acético a 25°C es $1{,}74 \cdot 10^{-5}$ M y el de pK_a es 4,76.

En el sistema intervienen dos equilibrios, el de ionización del ácido acético, ya señalado, y el de ionización del agua de la solución ($K_w = [H^+][OH^-]$), que se han de cumplir a lo largo de la titulación. Para simplificar, sólo atenderemos al del ácido.

Antes de iniciar la adición de NaOH, el pH del medio es el correspondiente al de la solución 0,1 N de ácido acético. Al agregar NaOH, se produce la reacción:

$$CH_3COOH + NaOH \rightarrow CH_3COO^- + Na^+ + H_2O$$

Los OH^- añadidos se combinan con H^+ para formar moléculas de H_2O. La disminución de $[H^+]$ es compensada por la ionización del ácido para formar acetato (sal). El valor de K_a se mantiene. El ácido débil que queda sin neutralizar, más el acetato que se forma, constituyen un sistema amortiguador cuyo pH puede ser calculado aplicando la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

Cuando se ha llegado a neutralizar el 50% del ácido originalmente presente, existirá en el medio igual cantidad de ácido y de acetato (sal). En este punto, el valor del pH coincidirá con el pK_a (4,76) (fig. 2-11).

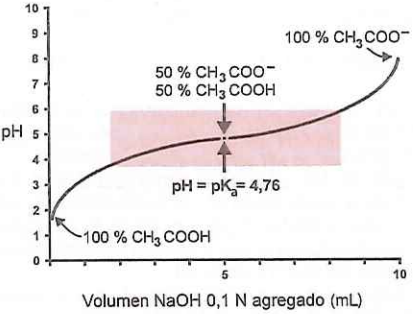


Fig. 2-11. Curva de titulación de ácido acético. El área en rosa indica la zona de amortiguación.

Si se continúa la titulación, el ácido restante se convierte gradualmente en acetato hasta neutralizarse totalmente cuando el número de equivalentes de base iguala al de ácido existente al comienzo de la experiencia. En este momento se produce una brusca inflexión hacia arriba de la curva; se ha llegado al punto de equivalencia. El pH en este punto no es el correspondiente a la neutralidad, sino que está desplazado hacia el lado alcalino (8,72). Esto se debe a la hidrólisis del acetato, que produce aumento de $[OH^-]$:

$$CH_3COO^- + H_2O \rightleftharpoons CH_3COOH + OH^-$$

Resulta de interés destacar el aplanamiento de la curva a ambos lados del punto medio de titulación (fig. 2-11). En una zona que abarca aproximadamente una unidad de pH por arriba y por debajo de ese punto medio, las adiciones de álcali producen relativamente menos variación del pH que hacia los extremos de la curva. Ello indica que la capacidad amortiguadora del sistema *buffer* formado es mayor en esa zona y que depende del valor de la relación [sal] / [ácido]. El rango dentro del cual el sistema es efectivo va desde el valor 1/10 hasta 10/1 en la relación [sal] / [ácido] y la capacidad es máxima cuando el cociente es igual a 1 ($pH = pK_a$). Aplicando estos valores a la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pK_a + \log \frac{[sal]}{[ácido]}$$

para [sal] / [ácido] = 1/10:

$$pH = pK_a + \log \frac{1}{10} = pK_a + \log 10^{-1} = pK_a - 1$$

para [sal] / [ácido] = 1:

$$pH = pK_a + \log 1 = pK_a + 0 = pK_a$$

para [sal] / [ácido] = 10/1:

$$pH = pK_a + \log \frac{10}{1} = pK_a + \log 10^{1} = pK_a + 1$$

Como conclusión, puede afirmarse que un *buffer* tiene mayor capacidad de amortiguación dentro del rango de pH comprendido entre $\pm 1 + pK_a$ del sistema.

APÉNDICE

Expresión de concentraciones

Concentración es la relación entre cantidad de soluto y la de solución o de solvente. Se utilizan distintos tipos de expresión.

Concentración porcentual. Para los componentes de líquidos biológicos es común indicar la cantidad de soluto (en masa: g, mg, μg, ng) disuelta en 100 partes de solvente (en volumen: 100 mL; se ha difundido el uso de una unidad equivalente, el decilitro: 1 dL = 0,1 litro = 100 mL).

Molaridad. Una cantidad de cualquier elemento igual a su masa atómica en gramos (átomo gramo) contiene $6{,}022 \cdot 10^{23}$ átomos (*número de Avogadro*). Por ejemplo, en 1 g de ^1H o en 12 g de ^{12}C existe el mismo número de átomos: $6{,}022 \cdot 10^{23}$.

Una cantidad de cualquier compuesto igual a su masa molecular en gramos (molécula gramo) posee $6{,}022 \cdot 10^{23}$ moléculas. Por ejemplo, 180 g de glucosa ($C_6H_{12}O_6$), 60 g de urea [$CO(NH_2)_2$], o 142 g de Na_2HPO_4, contienen $6{,}022 \cdot 10^{23}$ moléculas.

Puede definirse a un *mol* como la cantidad de materia que posee un número de Avogadro de partículas (electrones, iones o moléculas). Frecuentemente se usa una unidad mil veces menor, el *milimol* (mmol). En ciertos casos es necesario recurrir a unidades aún menores, como el *micromol* (μmol), igual a 10^{-6} mol, o el *nanomol* (nmol), igual a 10^{-9} mol.

Molaridad es el número de moles de soluto existente en un litro de solución y se indica por la notación M (m mayúscula). Una solución 1 M contiene un mol de soluto disuelto en 1 litro de solución: una 0,5 M contiene medio mol por litro; una 3 M, tres moles por litro.

Si se tiene una solución 0,2 M de $CaCl_2$, su concentración será de 0,2 mol de cloruro de calcio por litro de solución. Como esta sal se disocia según la ecuación:

$$CaCl_2 \rightarrow Ca^{2+} + 2Cl^-$$

la concentración de ion calcio en la solución será 0,2 M, ya que se forma igual número de iones calcio que el de moléculas originalmente presentes en la solución (suponiendo total disociación). En cambio, cada unidad fórmula $CaCl_2$ origina dos iones cloruro, de modo que la concentración

de Cl será 0,4 M. La molaridad corresponde a la relación:

$$M = \frac{\text{Moles}}{\text{Volumen (en litros)}}$$

La cantidad de moles existentes en una masa dada de sustancia se calcula por la relación:

$$M = \frac{\text{Masa (g)}}{\text{Masa molecular (g/mol)}}$$

Dadas las bajas concentraciones de algunos iones o sustancias en líquidos biológicos, resulta a veces más conveniente expresarlas en milimoles (concentración milimolar o mM) o en micromoles (concentración micromolar o μM) por litro.

Para calcular la molaridad de una solución cuando se conoce su concentración en gramos por litro, se aplica la fórmula:

$$\text{Molaridad (M/L)} = \frac{\text{Concentración (g/L)}}{\text{Masa molecular (g/mol)}}$$

Generalmente, las concentraciones de muchas sustancias en líquidos orgánicos se dan en mg por 100 mL o dL. Es preferible expresar la molaridad en milimoles por litro (concentración mM) que se calcula a partir de la concentración en mg por dL utilizando la fórmula:

$$\text{Molaridad (mM/L)} = \frac{\text{Concentración (mg/dL)} \times 10}{\text{Masa molecular (g/mol)}}$$

Por ej., la concentración de calcio en plasma es 10 mg por dL o 100 mL (masa atómico del Ca: 40). Su molaridad en milimoles por litro (mM) será:

$$\text{Molaridad (mM)} = \frac{10 \times 10}{40} = 2{,}5 \text{ mM}$$

Molalidad. Es el número de moles de soluto por 1.000 g de solvente. Se indica con el símbolo *m* (m minúscula). Esta notación tiene la ventaja de que la concentración no es influida por la temperatura y es útil para los cálculos de temperatura de ebullición o de congelamiento de soluciones. En la práctica química, sin embargo, se utilizan más frecuentemente soluciones molares, pues es común utilizar unidades de volumen al preparar soluciones. En este caso, es importante indicar la temperatura a la cual fue preparada la solución.

Equivalentes. Es habitual expresar concentraciones en términos de equivalente químico (Eq). Un *equivalente gramo* o *peso equivalente* es la masa en gramos de un elemento, ion o compuesto que puede desplazar a, o combinarse con, 1 g de hidrógeno u 8 g de oxígeno. En reacciones de oxidorreducción, 1 Eq es la cantidad de sustancia que gana o pierde un mol de electrones. En reacciones ácido-base, 1 Eq es la cantidad de ácido o base que libera o capta un mol de protones.

El peso equivalente es en realidad una unidad reactiva; de allí su utilidad en química. Expresando la concentración en Eq es posible comparar el número de unidades químicas que se combinan. Un Eq de un agente oxidante reacciona exactamente con 1 Eq de un reductor. Un Eq de ácido es neutralizado precisamente por 1 Eq de base. Un Eq de Na se combina exactamente con 1 Eq de Cl, de bicarbonato o de fosfato.

El peso equivalente de un elemento se calcula dividiendo su masa atómica por el número de electrones (*n*) que un átomo del elemento gana o pierde al reaccionar. Para ácidos o bases, se divide la masa de un mol por el número de protones (*n*) que cada molécula de ácido o base cede o acepta. En el caso de un ion, se divide el peso de un mol por el número de cargas eléctricas (*n*) que posee. Así, un equivalente de sodio es 23/1 = 23 g; un equivalente de cloruro, 35,5/1 = 35,5 g; un equivalente de calcio, 40/2 = 20 g; un equivalente de bicarbonato (CO_3H^-), 61/1 = 61 g; un equivalente de fosfato (PO_4^{3-}), 95/3 = 31,6 g.

Como las concentraciones de electrólitos en los líquidos orgánicos son bajas, se acostumbra expresarlas en *miliequivalentes (mEq) por litro*. Un miliequivalente es la milésima parte de un equivalente.

Frecuentemente, la concentración de un determinado ion en líquidos biológicos es indicada en miligramos por dL y resulta necesario convertir esta expresión en miliequivalentes por litro. La fórmula de conversión que se utiliza en ese caso es la siguiente:

$$\text{(mg/dL)} \times 10 \times \frac{n}{\text{Masa atómica}} = \text{mEq por litro}$$

Ejemplos: la concentración de sodio en plasma es de 322 mg por dL. Expresada en mEq por litro, dicha concentración será:

$$322 \times 10 \times \frac{1}{23} = 140 \text{ mEq por litro}$$

La concentración de calcio en plasma es de 10 mg por dL. Expresada en mEq/L será:

$$10 \times 10 \times \frac{2}{40} = 5 \text{ mEq por litro}$$

Potencias de 10

Los números de muchas cifras pueden expresarse, más simplemente, como potencias de 10:

$$10.000.000 = 10^7$$
$$7.320.000 = 7{,}32 \cdot 10^6$$
$$0{,}00001 = 10^{-5}$$
$$0{,}00000732 = 7{,}32 \cdot 10^{-6}$$
$$1/10.000.000 = 0{,}0000001 = 10^{-7}$$
$$1/10.000 = 0{,}0001 = 10^{-4}$$

Multiplicación de potencias de 10

El producto de potencias de 10 es igual a una potencia de 10 cuyo exponente es el resultado de la suma algebraica de los exponentes de los factores:

$$10^5 \cdot 10^6 = 10^{11}$$
$$10^{-9} \cdot 10^7 = 10^{-2}$$
$$10^{-4} \cdot 10^{-8} = 10^{-12}$$
$$10^3 \cdot 10^{-13} \cdot 10^{-7} = 10^{-17}$$

División de potencias de 10

La división de potencias de 10 es igual a una potencia de 10 cuyo exponente es el resultado de la diferencia entre los exponentes de dividendo y divisor:

$$10^5 \div 10^9 = 10^{-4}$$
$$10^6 \div 10^{-4} = 10^{10}$$

Logaritmo

Logaritmo de un número es el exponente al que hay que elevar la base para obtener ese número.

En las páginas precedentes hemos utilizado logaritmos decimales, en los cuales la base es 10. En este caso, entonces, logaritmo es el exponente al cual hay que elevar la base 10 para obtener ese número.

El logaritmo de 10 es la unidad:

$$\log 10 = \log 10^1 = 1$$

El logaritmo de 1 es 0:

$$\log 1 = \log 10^0 = 0$$

El logaritmo de un producto es igual a la suma de los logaritmos de los factores:

$$\log (a \cdot b) = \log a + \log b$$

El logaritmo de un cociente es igual a la diferencia de los logaritmos de dividendo y divisor:

$$\log a \div b = \log a - \log b$$

Número	*Potencia de 10*	*Logaritmo del número*
100.000	10^5	$\log 100.000 = \log 10^5 = 5$
100	10^2	$\log 100 = \log 10^2 = 2$
1	10^0	$\log 1 = \log 10^0 = 0$
0,01	10^{-2}	$\log 0{,}01 = \log 10^{-2} = -2$
0,0000001	10^{-7}	$\log 0{,}0000001 = \log 10^{-7} = -7$

RESUMEN

Alrededor del 65% de la masa corporal de un adulto humano está representado por agua. El punto de fusión, el de ebullición, el calor de vaporización, etc., del agua son más altos que los de otras sustancias comparables. Esas propiedades se explican si se tiene en cuenta la estructura molecular del agua. Los elementos que la constituyen (H–O–H) se disponen formando un ángulo de 104,5°, lo cual determina que el conjunto sea polar, ya que la carga negativa (alrededor del vértice, formado por el O) y la resultante de las cargas positivas de los núcleos de H están localizadas en sitios distintos. Esta distribución de cargas permite la formación de *puentes de hidrógeno* entre las moléculas (la carga positiva de un H de una molécula es atraída por la negativa del O de otra). Se pueden formar así complejos de fórmula $(H_2O)_n$. Estos complejos poliméricos son más comunes en el agua sólida (hielo) y líquida que en el vapor de agua. Cada molécula de agua puede formar "puentes de hidrógeno" con otras cuatro. En el hielo se forma una trama cristalina regular, con distancias fijas entre las moléculas. En el agua líquida, los puentes de H se forman y se rompen con facilidad (enlaces "oscilantes" o "fluctuantes") y las moléculas tienen libertad para acercarse más, razón por la cual el agua líquida es más densa que el hielo.

Gracias a su carácter polar, las moléculas de agua interactúan con las de otras sustancias. Los compuestos iónicos y los polares no iónicos establecen atracciones electrostáticas y puentes de hidrógeno, respectivamente, con las moléculas de agua y forman con ellas soluciones estables. Se dice que son

sustancias hidrófilas. Los compuestos apolares, en cambio, son hidrófobos y no se disuelven en el agua. Hay sustancias anfipáticas, que presentan grupos hidrófilos e hidrófobos en una misma molécula (por ejemplo: fosfolípidos, jabones de Na o de K). En el agua estas sustancias forman micelas, en las cuales las moléculas están orientadas, con sus grupos polares dirigidos hacia el medio acuoso.

El agua es un electrólito débil. Se ioniza en hidrógeno e hidróxido. En el agua pura a 25°C, la concentración de iones hidrógeno $[H^+]$ es 0,0000001 m o 10^{-7} m. Obviamente, la de iones hidróxido $[OH^-]$ es igual. El producto $[H^+]\times[OH^-]$ es un valor constante, designado *producto iónico del agua* (K_w). Su valor a 25°C es: $K_w = [H^+]\times[OH^-] = 10^{-7} \times 10^{-7} = 10^{-14}$. Esta constante se mantiene tanto en el agua pura como en soluciones acuosas. Por tal razón, cuando se agrega en solución acuosa una sustancia que produzca aumento de $[H^+]$ o de $[OH^-]$, inmediatamente ocurre una disminución de $[OH^-]$ o de $[H^+]$, respectivamente, para que el valor del producto $[H^+] \cdot [OH^-]$ siga siendo 10^{-14}.

Ácidos y bases. Cuando $[H^+]$ es igual a $[OH^-]$, la solución es *neutra*. Toda sustancia que al disolverse en el agua produzca aumento de $[H^+]$ es *ácida*; las que disminuyen la $[H^+]$ son *bases* o *álcalis*. Según Bronsted y Lowry, son ácidos los compuestos o iones capaces de ceder protones (H^+) a la solución, y bases, los que pueden aceptar protones del medio.

Para simplificar la expresión de $[H^+]$ se propuso la notación pH. El pH corresponde al logaritmo de la inversa de la $[H^+]$ o, en otros términos, al logaritmo negativo de $[H^+]$. Para el agua pura a 25°C, $[H^+] = 10^{-7}$ m y el pH = $-\log 10^{-7} = 7$. A esta temperatura, son ácidas las soluciones que tienen pH por debajo de 7, y alcalinas o básicas, las de pH superior a 7.

Soluciones amortiguadoras o buffers. Reducen los cambios en la $[H^+]$ producidos por adición de ácidos o bases. Una solución o sistema *buffer* está generalmente constituido por una mezcla de un electrólito débil (más comúnmente un ácido débil) y una sal de éste que actúa como electrólito fuerte. El pH de las soluciones amortiguadoras puede ser calculado conociendo la constante de disociación del ácido (K_a) y las concentraciones iniciales del ácido y de la sal. La *ecuación de Henderson-Hasselbalch* expresa esa relación:

$$pH = pK_a + \log \frac{[sal]}{[ácido]}$$

Las soluciones amortiguadoras tienen mayor capacidad de amortiguación dentro del rango de pH comprendido entre $\pm 1 + pK_a$.

La curva de titulación de ácidos débiles se obtiene representando en un sistema de coordenadas los cambios de pH producidos al neutralizar un ácido débil mediante una base fuerte. Las concentraciones de los componentes del sistema *buffer* que se forma en el curso de la titulación van cambiando a medida que se agrega base. Se observa que la capacidad de amortiguación es máxima cuando el pH es igual al pK_a.

BIBLIOGRAFÍA

Chaplin M. (2006). Do we underestimate the role of water in cell biology? *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, 7: 861-866.

Nicolls P. (2000). Introduction to the biology of the water molecule. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57: 987-992.

Paladini A.C., (1983). Agua. En Torres H.N., Carminatti H., Cardini C.E. (Eds.), *Bioquímica General*, 81-90, El Ateneo, Buenos Aires.

Stewart P.A. (1981). *How to understand Acid-Base: A quantitative acid-base primer for biology and medicine*. Edward Arnold Ltd., Londres.

CAPÍTULO 3

Proteínas

Las proteínas ocupan un lugar de máxima importancia entre las moléculas constituyentes de los seres vivos. En los vertebrados, las proteínas son los compuestos orgánicos más abundantes, pues representan alrededor del 50% del peso seco de los tejidos. Prácticamente todos los procesos biológicos dependen de la presencia y/o actividad de este tipo de sustancias. Bastan algunos ejemplos para dar idea de la variedad y trascendencia de funciones a ellas asignadas. Son proteínas casi todas las *enzimas*, catalizadores de reacciones químicas en organismos vivientes; muchas *hormonas*, reguladores de actividades celulares; la *hemoglobina* y otras moléculas con funciones de transporte en la sangre; *anticuerpos*, encargados de acciones de defensa natural contra infecciones o agentes extraños; los *receptores* de las células, a los cuales se fijan moléculas capaces de desencadenar una respuesta determinada; la *actina* y la *miosina*, responsables finales del acortamiento del músculo durante la contracción; el *colágeno*, integrante de fibras altamente resistentes en tejidos de sostén.

Se ha avanzado enormemente durante los últimos 50 años en el conocimiento de este grupo de sustancias; hoy es posible interpretar mecanismos íntimos que condicionan muchos procesos vitales y, sobre todo, demostrar la estrecha relación existente entre estructura molecular y función.

Uno de los problemas más difíciles planteados inicialmente a los investigadores en este campo fue aislar y purificar una determinada proteína a partir de la complejísima mezcla de moléculas que constituye la materia viva. El perfeccionamiento de métodos de separación ha permitido obtener proteínas al estado puro, cristalino, apto para el estudio de su estructura y propiedades.

Todas las proteínas contienen carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno y casi todas poseen también azufre. Si bien hay ligeras variaciones en diferentes proteínas, el contenido de nitrógeno representa, término medio, 16% de la masa total de la molécula; es decir, cada 6,25 g de proteína contienen 1 g de N. El factor 6,25 se utiliza para estimar la cantidad de proteína existente en una muestra a partir de la medición del N de la misma.

Las proteínas son macromoléculas formadas por aminoácidos

Las proteínas son moléculas de enorme tamaño; pertenecen a la categoría de *macromoléculas*, constituidas por gran número de unidades estructurales. En otros términos, se trata de *polímeros* (*poli*: muchos; *meros*: partes).

Debido a su gran tamaño, cuando estas moléculas se esparcen en un solvente adecuado, forman obligadamente dispersiones coloidales, con características que las distinguen de las soluciones de moléculas pequeñas.

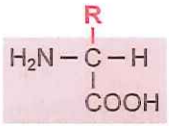
Por hidrólisis,[1] las moléculas proteínicas son escindidas en numerosos compuestos relativamente simples, de pequeño peso, que son las unidades fundamentales constituyentes de la macromolécula. Estas unidades son los *aminoácidos*, de los cuales existen veinte especies diferentes. Cientos o miles de estos aminoácidos pueden participar en la formación de la gran molécula polimérica de una proteína.

1 Se denomina hidrólisis a la ruptura de un enlace covalente por adición de agua en condiciones adecuadas.

Como los aminoácidos son los bloques unitarios o "ladrillos" con los cuales se construye el gran edificio molecular de las proteínas, se considerarán en primer término su estructura y propiedades.

AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos constituyentes de proteínas son compuestos que poseen un grupo ácido, carboxilo (–COOH) y un grupo básico, amina ($-NH_2$), unido al carbono α (el carbono α de un ácido orgánico es el inmediato al carboxilo). Son, entonces, α-aminoácidos y su fórmula general es:



donde R corresponde a la cadena lateral, diferente para cada uno de los veinte aminoácidos distintos que se obtienen de la hidrólisis de proteínas.

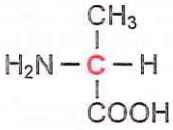
De acuerdo con la fórmula general presentada, todos los aminoácidos (excepto glicina, en la cual R es un hidrógeno) tienen las cuatro valencias del carbono α saturadas por grupos diferentes. Este hecho determina la existencia de dos isómeros ópticos, con configuración espacial distinta, para cada aminoácido.

Isomería óptica

Se denominan *isómeros* a compuestos diferentes con la misma fórmula molecular. Contienen igual número y clase de átomos, pero unidos entre sí de manera distinta. Cuando difieren en su disposición espacial, se tienen isómeros espaciales o *estereoisómeros*, categoría a la cual pertenecen los isómeros ópticos.

Según la teoría tetraédrica, los cuatro enlaces del átomo de carbono son equivalentes y orientados hacia los vértices de un tetraedro regular. Cuando cada una de las valencias está saturada por elementos o grupos atómicos diferentes, la molécula resulta asimétrica. Se dice en ese caso que el carbono es *asimétrico*.

Por ejemplo, en el aminoácido alanina:



el carbono en rojo es asimétrico porque está unido a cuatro grupos atómicos diferentes (–H, $-CH_3$, $-NH_2$ y –COOH).

Los grupos unidos al carbono asimétrico central pueden ser dispuestos en el espacio de dos maneras diferentes. De ello resultan dos moléculas, cada una de las cuales es la imagen en el espejo de la otra. Estos isómeros no son superponibles; guardan entre sí la misma relación existente entre la mano izquierda y la derecha, de allí el nombre de compuestos *quirales* dado a este tipo de isómeros (del griego *kiros*: mano). Se los conoce también como *isómeros ópticos*, *enantiomorfos* o *enantiómeros*. La figura 3-1 presenta los dos isómeros ópticos de la alanina.

Isómeros de este tipo poseen muchas de sus propiedades químicas iguales y propiedades físicas idénticas, excepto su capacidad para desviar el plano de vibración de la luz polarizada en uno u otro sentido.

Luz polarizada. Un haz de luz ordinaria está compuesto por vibraciones dispuestas en todos los planos que se intersectan en el eje de propagación del haz (fig. 3-2). Se llama luz polarizada a aquella cuyas vibraciones ocupan sólo uno de esos planos. Se puede obtener luz polarizada haciendo pasar un haz de luz ordinaria a través de un prisma de Nicol

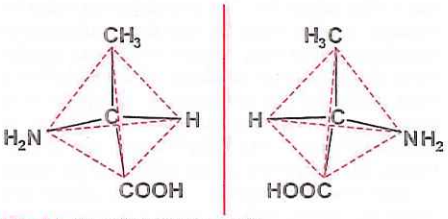


Fig. 3-1. Enantiómeros de alanina.

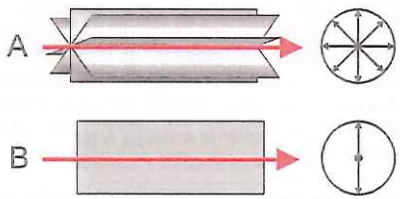


Fig. 3-2. A. Representación idealizada de un haz de luz ordinaria. El círculo a la derecha representa el corte transversal ideal del haz de luz. Se indican algunos de los infinitos planos que se intersectan en el eje de propagación del haz y en los cuales tienen lugar las vibraciones que componen la luz. B. Haz de luz polarizada. Las vibraciones sólo ocupan un plano.

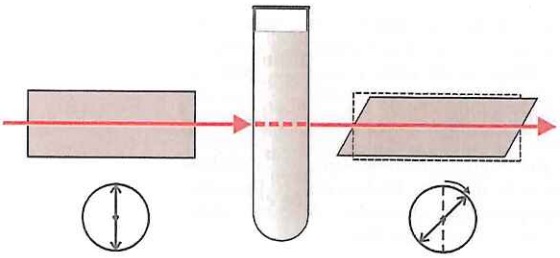


Fig. 3-3. Rotación de la luz polarizada. El plano de vibración de la luz, después de atravesar el tubo que contiene una solución de una sustancia ópticamente activa, es desviado de su posición original (en este caso, hacia la derecha).

(dispositivo construido con cristales de calcita), o de un material sintético llamado Polaroid. La luz que ha atravesado estos medios está constituida por vibraciones en un solo plano.

Actividad óptica. Si un haz de luz polarizada atraviesa una solución de un compuesto quiral, el plano de vibración es rotado sobre su eje y desviado a otra posición (fig. 3-3). Se dice que la sustancia es *ópticamente activa*. Por convención, cuando el giro tiene el sentido del movimiento de las agujas del reloj, se lo considera hacia la derecha o positivo (+); la rotación en sentido contrario es izquierda o negativa (–).

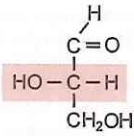
Los compuestos que desvían hacia la derecha el plano de vibración de la luz polarizada se llaman dextrorrotatorios o *dextrógiros* y los que lo rotan hacia la izquierda son levorrotatorios o *levógiros*.

La magnitud de la rotación se determina mediante un aparato llamado polarímetro, que permite medir el ángulo del giro producido en el plano de la luz.

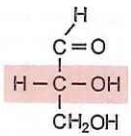
En condiciones determinadas de temperatura, longitud de onda de la luz incidente, concentración de sustancia en la solución y espesor de solución recorrido por la luz, cada compuesto produce un giro definido del plano de la luz polarizada, correspondiente a la *rotación específica*, característica para cada sustancia ópticamente activa. Los dos isómeros ópticos de un mismo compuesto desvían la luz polarizada en un ángulo exactamente igual, uno hacia la derecha (dextrógiro) y el otro hacia la izquierda (levógiro).

Notación. Los isómeros ópticos se distinguen por la configuración de los cuatro sustituyentes en torno al átomo de carbono quiral o asimétrico, lo cual se puede determinar mediante estudios de difracción de rayos X.

El compuesto de referencia es el gliceraldehído. Los dos isómeros ópticos de esta sustancia, uno levógiro y otro dextrógiro, se designan anteponiendo al nombre las letras L y D respectivamente y sus fórmulas se indican de la siguiente manera:



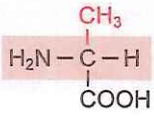
L-gliceraldehído



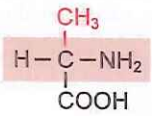
D-gliceraldehído

El isómero L es representado con el hidroxilo unido al carbono asimétrico hacia la izquierda y el isómero D, con dicho grupo hacia la derecha.

Por convención, todos los compuestos de configuración comparable a la del L-gliceraldehído, son denominados L, aun cuando no sean levógiros, y los relacionados con la disposición espacial del D-gliceraldehído, son llamados D aunque no sean dextrógiros. De este modo, D y L denotan la configuración, y no corresponden en todos los casos a compuestos dextrógiros y levógiros respectivamente. Por esta razón se debe indicar el sentido de la rotación con un signo (+) o (–) a continuación de la letra. La L-alanina, por ejemplo, tiene una rotación específica de +1,8°; su notación es L(+)-alanina.



L-alanina



D-alanina

Para evitar las ambigüedades de la designación D-L, se ha propuesto otro sistema, llamado RS. En este texto seguiremos utilizando la notación D-L. Todos los aminoácidos, excepto la glicina, presentan isómeros D y L. Los aminoácidos isoleucina y treonina tienen un segundo carbono asimétrico además del α, razón por la cual exis-

ten cuatro isómeros de cada uno. Sólo uno de esos cuatro participa en la constitución de proteínas.

Las células de los seres vivos distinguen con gran eficiencia los estereoisómeros. Sólo los aminoácidos de configuración L son incorporados a proteínas y presentan mayor interés en bioquímica humana. A ellos nos referiremos casi exclusivamente en lo sucesivo. En los casos en los cuales no se antepone letra al nombre, debe entenderse que se trata de L-aminoácidos.

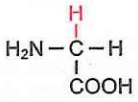
Clasificación de aminoácidos

De los α-aminoácidos obtenidos por hidrólisis de proteínas, la mayoría posee un grupo ácido carboxilo y un grupo básico amina, razón por la cual se los considera neutros. Dos de ellos tienen un grupo carboxilo adicional que les confiere carácter ácido, mientras otros poseen grupos básicos adicionales. Dos de los aminoácidos contienen azufre en su molécula. Finalmente hay uno, denominado prolina, en el cual el carbono adyacente al de la función carboxilo forma parte de un ciclo.

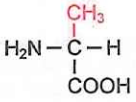
A continuación se presentan los aminoácidos constituyentes de proteínas, agrupados según las características de sus cadenas laterales. Habitualmente se utilizan notaciones abreviadas, una de tres y otra de una letra, para indicar cada aminoácido. Ambas figuran al pie de la fórmula respectiva. Las cadenas laterales se representan en rojo.

Aminoácidos alifáticos neutros con cadena no polar

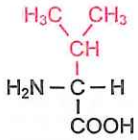
Glicina posee sólo un hidrógeno además de los grupos carboxilo y amina; estos grupos polares predominan claramente en su molécula. *Alanina*, con un metilo como cadena lateral, es más soluble en agua que los siguientes, en los cuales la cadena hidrofóbica es de mayor tamaño. *Valina*, *leucina* e *isoleucina* tienen cadenas apolares ramificadas.



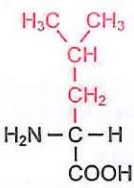
Glicina o glicocola
(Gly - G)



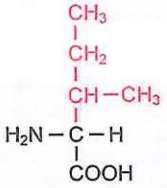
Alanina
(Ala - A)



Valina
(Val - V)



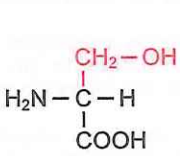
Leucina
(Leu - L)



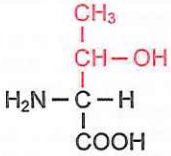
Isoleucina
(Ile - I)

Aminoácidos alifáticos neutros con cadena polar no ionizable

Serina y *treonina* contienen en su cadena lateral una función hidroxilo que les otorga carácter polar.



Serina
(Ser - S)

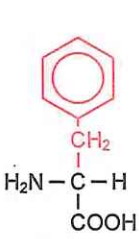


Treonina
(Thr - T)

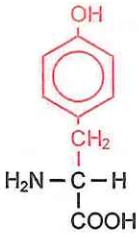
Aminoácidos neutros aromáticos

Fenilalanina posee un núcleo bencénico y *triptófano*, el núcleo heterocíclico indol; ambos apolares y marcadamente hidrófobos. *Tirosina* tiene un hidroxilo fenólico que le da polaridad. Por encima de pH 10 libera un protón y adquiere carga negativa.

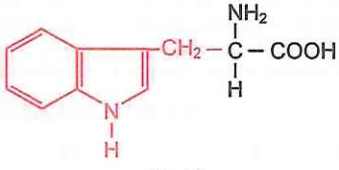
Los aminoácidos aromáticos absorben fuertemente la luz en la región ultravioleta del espectro (280 nm). Esta propiedad es usada para detectar la presencia de proteínas en una muestra.



Fenilalanina
(Phen - F)



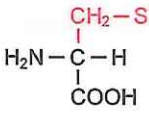
Tirosina
(Tyr - Y)



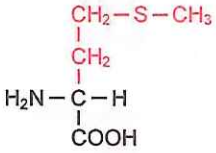
Triptófano
(Trp - W)

Aminoácidos con azufre

Cisteína contiene el grupo –SH (sulfhidrilo), ligeramente polar; a pH 9 libera un protón. La cadena lateral de *metionina* es apolar.



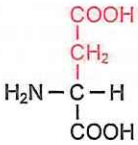
Cisteína
(Cys - C)



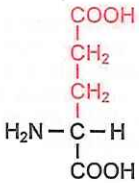
Metionina
(Met - M)

Aminoácidos ácidos (dicarboxílicos)

Ácido aspártico y *ácido glutámico* son aminoácidos con un carboxilo adicional que puede liberar un protón y adquirir carga negativa al pH de los líquidos biológicos. A menudo se los designa con el nombre de la forma ionizada, *aspartato* y *glutamato*.

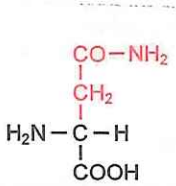


Acido aspártico
(Asp - D)

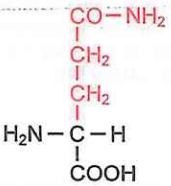


Acido glutámico
(Glu - D)

Asparragina y *glutamina* son derivados de los aminoácidos ácido aspártico y glutámico respectivamente; poseen función *amida* en el carbono distal al Cα. A diferencia de sus análogos acídicos, asparragina y glutamina no tienen carga en su cadena lateral, pero son decididamente polares.



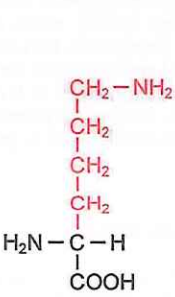
Asparragina
(Asn - N)



Glutamina
(Gln - Q)

Aminoácidos básicos

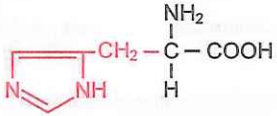
Son aminoácidos con carga positiva al pH reinante en las células. *Lisina*, con una función amina adicional, y *arginina*, con un grupo guanidina, pueden aceptar protones.



Lisina
(Lys - K)

Arginina
(Arg - R)

Histidina tiene el núcleo heterocíclico imidazol, uno de cuyos nitrógenos puede adquirir una carga positiva. El pK_a de ionización del imidazol en la cadena de histidina es de alrededor de 6,0. Todos los aminoácidos básicos son fuertemente polares.

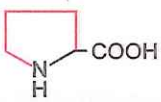


Histidina
(His - H)

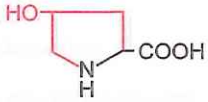
En la proteína del colágeno se encuentra hidroxilisina, derivado de la lisina con un hidroxilo en el carbono 5 (los carbonos de la cadena se cuentan a partir del que posee la función carboxilo).

Prolina

En la *prolina* el carbono α y el nitrógeno a él unido están incluidos en un ciclo pirrolidina. El compuesto tiene carácter alifático.



Prolina
(Pro - P)

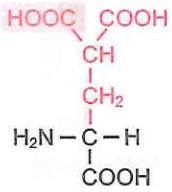


4-hidroxiprolina

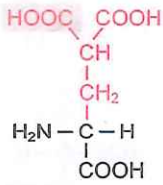
Algunos autores consideran que el nitrógeno forma una función imino (=NH), razón por la cual llaman a la prolina *iminoácido*. La inclusión del carbono α y el N en el anillo otorga a las uniones de esos átomos mayor rigidez que la existente en los otros aminoácidos. En algunas proteínas se encuentra un derivado hidroxilado de la prolina, la hidroxiprolina.

Otros aminoácidos

Los aminoácidos presentados participan en la constitución de proteínas. Algunos de ellos suelen sufrir modificaciones por adición covalente de diferentes grupos. Por ejemplo, además de 4-hidroxiprolina y 5-hidroxilisina, ya mencionados, fosfoserina, y γ-carboxiglutámico.

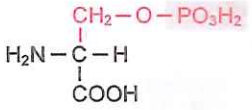


Ácido
γ-carboxiglutámico

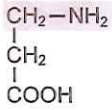


Ácido
γ-carboxiglutámico

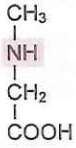
Mucho menos frecuentes que los mencionados son aminoácidos que resultan de reemplazar el azufre de la cisteína y metionina por selenio, llamados selenocisteína y selenometionina.



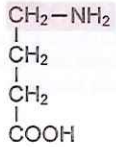
O-fosfoserina



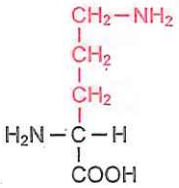
β-alanina



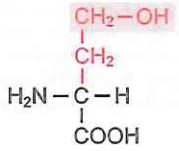
Sarcosina



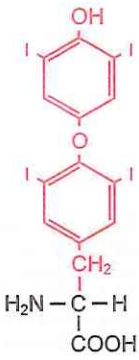
Ácido
γ-aminobutírico



Ornitina



Homoserina



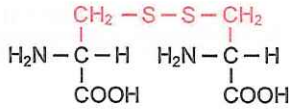
Tiroxina

Se han caracterizado unas 15 proteínas (selenoproteínas) que poseen estos selenoaminoácidos. La selenocisteína se encuentra preferentemente en proteínas de origen animal; la selenometionina, en las procedentes de vegetales.

Otros aminoácidos biológicamente importantes, como β-alanina, D-alanina, sarcosina, γ-aminobutírico, D-ácido glutámico, ornitina, homoserina, tiroxina, citrulina (pág. 336), homocisteína (pág. 344), se encuentran libres o integrando moléculas no proteínicas.

Propiedades de aminoácidos

Las propiedades de la cadena de cada aminoácido permiten predecir su comportamiento. El grupo sulfhidrilo de cisteína es altamente reactivo y con facilidad se combina con otro similar para formar uniones disulfuro (–S–S–). Dos cisteínas ligadas por este tipo de enlace covalente forman *cistina*.



Cistina

El grupo carboxilo adicional de ácidos aspártico y glutámico, además de otorgarles carácter ácido, da a estos aminoácidos la propiedad de interactuar con sustancias básicas para formar uniones de tipo salino. También pueden establecer atracciones electrostáticas de este tipo los aminoácidos diaminados.

Las características de las cadenas laterales permiten agrupar los aminoácidos en:

Polares: glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, ácido aspártico, ácido glutámico, asparragina, glutamina, lisina, histidina y arginina.

Apolares: alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano y prolina.

Propiedades ácido-base de aminoácidos

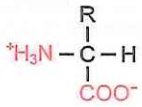
La existencia, en una misma molécula, de grupos ácido y básico, da a los aminoácidos propiedades eléctricas particulares. Como se ha visto, el grupo carboxilo se comporta como ácido o dador de protones:

$$-COOH \rightarrow -COO^- + H^+$$

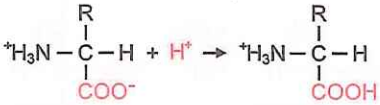
el grupo amina acepta protones; actúa como base:

$$-NH_2 + H^+ \rightarrow -NH_3^+$$

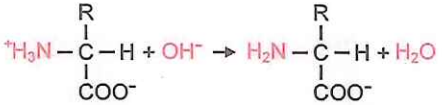
En las fórmulas precedentes se ha presentado a los aminoácidos con sus funciones no ionizadas, situación improbable en los medios biológicos. En realidad, al estado cristalino o en soluciones acuosas, estos compuestos se encuentran ionizados, con cargas positiva y negativa sobre la misma molécula. Por esta razón, se dice que los aminoácidos son *iones dipolares*, *anfolitos* o *anfóteros*. El vocablo alemán *zwitterion* también se utiliza para designar este tipo de iones. Por ello, es más correcto representar a los α-aminoácidos como iones dipolares (en rojo, los grupos disociados):



En soluciones ácidas fuertes, el ion dipolar capta un ion hidrógeno o protón a nivel de su carboxilo, el cual, en esas condiciones, se comporta como una base. El aminoácido se convierte entonces en un *catión* con carga positiva, migra hacia el cátodo si se establece un campo eléctrico en la solución.



En solución alcalina, el protón de la función $-NH_3^+$ reacciona con iones hidróxido para formar agua y el aminoácido queda cargado negativamente (ion negativo o *anión*). Es decir, a un pH fuertemente alcalino, el grupo $-NH_3^+$ se comporta como ácido.



La carga eléctrica del aminoácido depende del pH del medio en el cual está disuelto. Si la concentración de iones hidrógeno aumenta en el medio, los iones $-COO^-$ (carboxilato) captan protones, disminuyen progresivamente las formas iónicas dipolares y se forman cationes. En cambio, cuando disminuye la concentración de H^+, esto es, aumenta la de OH^-, los grupos $-NH_3^+$ ceden H^+, pierden su carga y se forman aniones.

Hay un valor de pH, característico para cada aminoácido, en el cual la ionización de cargas positivas y negativas se iguala y, por lo tanto, la carga total del aminoácido es nula. A este valor de pH se lo denomina *punto isoeléctrico* (pHi o pI).

En estas condiciones, el aminoácido no tiende a desplazarse hacia ninguno de los polos cuando se establece un campo eléctrico a través de la solución.

En los aminoácidos dicarboxílicos o diaminados existe un grupo ionizable adicional. Al analizar el comportamiento del ácido aspártico, por ejemplo, se puede comprobar que en un medio ácido fuerte está completamente protonado. Si se alcaliniza la solución por adición de una base fuerte (NaOH), el aminoácido cederá protones. El ácido aspártico forma sucesivamente distintas especies iónicas a medida que el pH aumenta (fig. 3-4).

Análoga comprobación se puede hacer con aminoácidos diaminados como, por ej., la lisina (fig. 3-5).

Curva de titulación de aminoácidos

El estudio de las curvas de titulación de ácidos y bases débiles, consideradas en el capítulo anterior, tiene interés para comprender el comportamiento ácido-base de esas sustancias en solución. Analizaremos la curva correspondiente a un aminoácido con dos grupos ionizables y tomaremos como ejemplo la alanina (^+H_3N–CHR–COO^-; R corresponde a metilo en la alanina).

Los equilibrios de disociación para cada uno de los grupos ionizables del aminoácido se indican en las ecuaciones siguientes:

Para el carboxilo:

$$^+H_3N\text{–CHR–COOH} \rightleftharpoons {}^+H_3N\text{–CHR–}COO^- + H^+$$

$$K_1 = \frac{[^+H_3N - CHR - COO^-][H^+]}{[^+H_3N - CHR - COOH]}$$

Para la amina:

$$^+H_3N\text{–CHR–}COO^- \rightleftharpoons H_2N\text{–CHR–}COO^- + H^+$$

$$K_2 = \frac{[H_2N - CHR - COO^-][H^+]}{[^+H_3N - CHR - COO^-]}$$

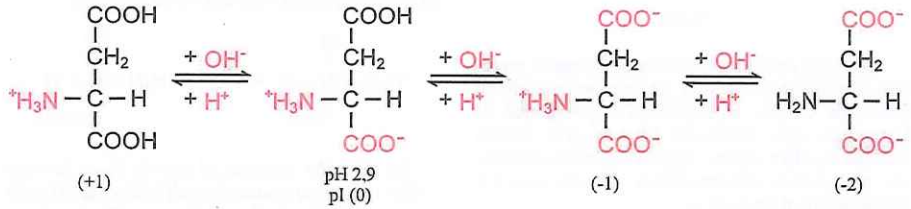


Fig. 3-4. Efecto del pH sobre la carga eléctrica del ácido aspártico. Entre paréntesis, valor y signo de la carga neta.

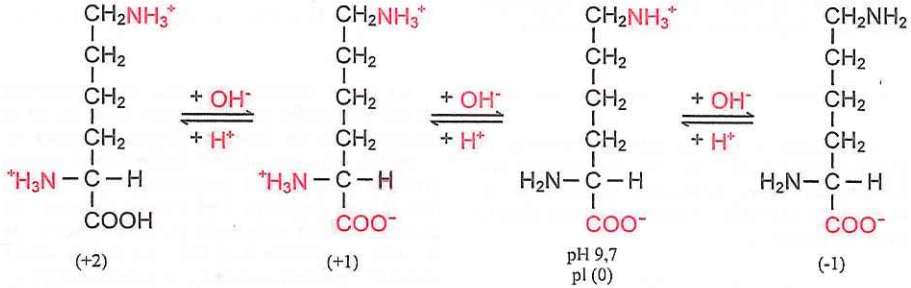


Fig. 3-5. Efecto del pH del medio sobre la carga eléctrica de la lisina. Entre paréntesis, valor y signo de la carga neta.

En una solución de alanina en agua pura, las dos funciones del aminoácido están ionizadas y el pH del medio es el correspondiente al punto isoeléctrico de alanina (pH = 6,02). A partir de este punto se pueden realizar dos titulaciones por separado, la del grupo $-COO^-$, que se comporta como una base al aceptar protones y la del grupo $-NH_3^+$, que actúa como ácido débil, liberando H^+. Para la primera neutralización puede utilizarse una solución de HCl y para la segunda, una de NaOH. La representación conjunta de los cambios de pH producidos en el curso de ambas valoraciones da una curva bifásica (fig. 3-6).

Antes de agregar HCl, todas las moléculas del aminoácido se encuentran al estado de ion dipolar (pH = 6,02 = pHi). La adición de ácido aumenta la concentración de H^+ del medio y determina la aceptación de protones por parte de grupos $-COO^-$. Al llegar a pH 2,34, la mitad de los grupos –COOH presentes se encuentra al estado no ionizado; las concentraciones de las formas $^+H_3N–CHR–COOH$ y $^+H_3N–CHR–COO^-$ se igualan. Dicho valor de pH corresponde al pK_a del carboxilo (pK_{a1}). Si se continúa agregando ácido, se alcanza un punto en el cual prácticamente todas las moléculas de aminoácido están protonadas ($^+H_3N–CHR–COOH$), situación que corresponde al extremo inferior de la gráfica.

La mitad superior de la curva se obtiene por titulación con NaOH. A partir del pHi, el aumento de la concentración de OH^- provocado por la adición del álcali determina la sustracción de H^+ del medio para formar agua. Esto crea una nueva situación de equilibrio, en la cual los grupos $-NH_3^+$ se comportan como ácido débil, liberando

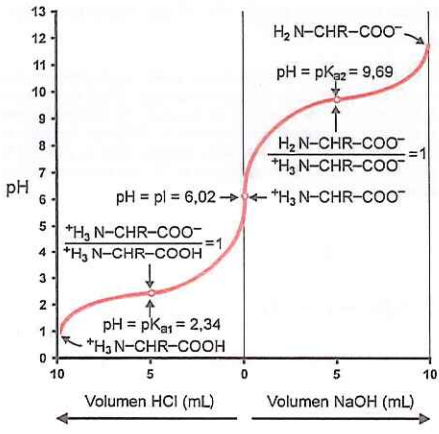


Fig. 3-6. Curva de titulación de alanina.

protones. El punto medio de esta segunda fase se alcanza cuando las concentraciones de los iones $^+H_3N–CHR–COO^-$ y $H_2N–CHR–COO^-$ son iguales, lo cual sucede a pH 9,69, valor igual al pK_a del grupo $-NH_3^+$ de la alanina (pK_{a2}). Si se continúa añadiendo NaOH hasta total neutralización, los grupos NH_3^+ terminan por liberar sus H^+ y el compuesto queda finalmente desprotonado ($H_2N–CHR–COO^-$).

La curva de titulación permite determinar los valores de pK_a de cada uno de los grupos ionizables del aminoácido. El aplanamiento de la gráfica en las cercanías de los puntos correspondientes a los pK_a, indica que el aminoácido puede actuar como amortiguador o *buffer* en esas dos zonas de pH. La gráfica indica también el pHi en el punto de inflexión que separa las dos fases de la curva.

Todos los aminoácidos neutros, es decir, los que poseen una cadena lateral no ionizable, dan curvas de titulación similares a las de alanina. Los valores de pK_{a1} (del grupo carboxilo inmediato al Cα) de los distintos aminoácidos, si bien son ligeramente diferentes entre sí, son todos próximos a 2; los valores de pK_{a2} (del grupo amina unido al Cα) varían entre 9 y 10.

Los aminoácidos con un tercer grupo ionizable en la cadena lateral dan curvas de titulación trifásicas y tienen tres valores de pK_a. Además de los aminoácidos dicarboxílicos y de los básicos, deben incluirse en este grupo cisteína y tirosina, cuyos grupos –SH y fenol, respectivamente, actúan como ácido débil. En general, los valores de pK_a para los grupos ionizables se encuentran alejados del pH habitual en nuestro organismo (cercano a la neutralidad). A esto hace excepción la histidina, en la cual uno de los N del núcleo imidazol puede captar un protón. Como el pK_a de ese grupo tiene un valor de 6,0, la histidina es el único aminoácido que actúa como amortiguador al pH fisiológico.

Propiedades químicas de aminoácidos

Los aminoácidos participan en muchas reacciones químicas. Algunas de ellas comprenden a los grupos amina o carboxilo unidos al carbono α, otras son específicas de determinadas cadenas laterales y sirven para identificar en una muestra la existencia de un aminoácido en particular.

Un reactivo muy utilizado para el reconocimiento de α-aminoácidos es la *ninhidrina*. El grupo α-amina da con esta sustancia un compuesto de intenso color púrpura. La prolina, en cambio, da un producto color amarillo. La ninhidrina no sólo se utiliza para reconocimiento

de aminoácidos, sino también en determinaciones colorimétricas de su concentración. La reacción es notablemente sensible y permite medir muy pequeñas cantidades de aminoácidos (del orden nanomolar, 10^{-9} mol). Aún mayor sensibilidad se ha alcanzado con el uso de técnicas de detección de fluorescencia. Los aminoácidos reaccionan con o-ftalaldehído para dar un derivado indólico fluorescente. Con estos métodos las determinaciones de aminoácidos han alcanzado un extraordinario poder. Las técnicas fluorométricas permiten medir concentraciones menores de 10^{-15} molar.

Uno de los grandes problemas en el estudio de proteínas ha sido separar y determinar los distintos aminoácidos en una mezcla compleja de todos ellos como, por ejemplo, la resultante de la hidrólisis total de una proteína mediante tratamiento con ácido concentrado. La introducción de métodos cromatográficos, como cromatografía en papel, en capa delgada y en columnas de intercambio iónico, ha significado un extraordinario avance en este campo. La gran sensibilidad de estas técnicas permite identificar aminoácidos aun en ínfimas concentraciones.

PÉPTIDOS

Unión peptídica

Los aminoácidos pueden establecer enlaces covalentes entre el grupo carboxilo de uno y el nitrógeno del grupo α-amina de otro. Esta unión, denominada *peptídica*, es de tipo amida y se produce con pérdida de agua (fig. 3-7).

El producto formado cuando se unen de esta manera dos aminoácidos se llama *dipéptido*. Es posible seguir agregando unidades aminoacídicas con el mismo tipo de unión para formar tripéptidos, tetrapéptidos, pentapéptidos, etc. En general, se denominan *polipéptidos* los polímeros formados por más de diez aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Cuando la cadena polipeptídica tiene masa molecular[2] mayor de 6.000 Da (daltons) (lo cual corresponde a polímeros de más de 50 unidades aminoacídicas), la molécula es considerada una proteína. Por debajo de esa masa, se acostumbra designar *péptidos* a estos compuestos. No hay un límite preciso entre péptidos y proteínas; el de 6.000 Da es arbitrario y se ha elegido porque es la masa aproximada de insulina, hormona producida en el páncreas y primera proteína cuya estructura completa fue conocida con exactitud.

Toda cadena polipeptídica tiene un extremo en el cual queda un aminoácido con su grupo α-amina libre; por convención, se considera a éste como el comienzo de la cadena y se lo llama extremo *amino-terminal* o *N-terminal*. La otra punta posee libre el grupo carboxilo unido al carbono α; es el extremo final, *carboxilo-terminal* o *C-terminal*. Los aminoácidos constituyentes de péptidos o proteínas pierden en la unión peptídica un H del grupo amina y OH del carboxilo; por ello, una vez integradas en la cadena, las unidades que forman el polímero son *restos* o *residuos* de aminoácidos.

Nomenclatura

Los péptidos se nombran siguiendo el orden de los restos de aminoácidos integrantes a partir del que posee el grupo α-amina libre. Los residuos de aminoácidos se indican por la raíz de su nombre seguida por el sufijo "*il*". El último residuo (con el grupo carboxilo libre) se menciona con su nombre completo. Por ejemplo, en el caso del hexapéptido formado por serina, ácido aspártico, tirosina, lisina, alanina y cisteína (fig. 3-8), el nombre será seril-aspartil-tirosil-lisil-alanil-cisteína, que puede abreviarse ser-asp-tyr-lys-ala-cys, o SDYKAC.

2 Masa molecular es la masa de una molécula expresada en daltons (Da) o unidades de masa atómica (uma). El dalton o uma se define como 1/12 de la masa de un átomo de ^{12}C. Frecuentemente se utiliza el múltiplo kilodalton (kDa = 1.000 Da). También se expresa como masa relativa (Mr), relación entre la masa de la molécula y 1/12 de la de un átomo de ^{12}C. Mr es una magnitud adimensional.

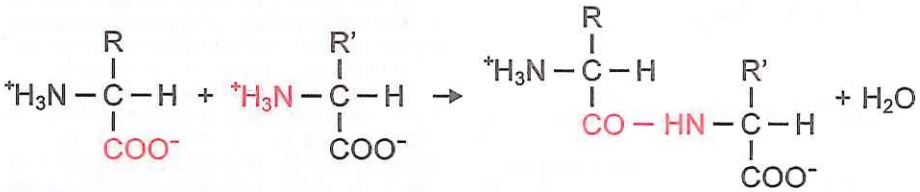


Fig. 3-7. Unión peptídica.

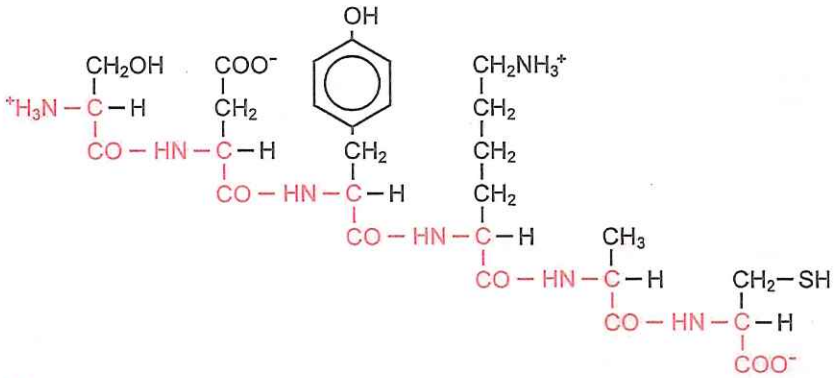


Fig. 3-8. Hexapéptido seril-aspartil-tirosil-lisil-alanil-cisteína. La sucesión de uniones peptídicas (en rojo) forma la "columna vertebral" de la molécula.

Propiedades ácido-base

Los grupos carboxilo y α-amina interesados en las uniones peptídicas han perdido OH e H respectivamente y ya no pueden ionizarse. Las propiedades ácido-base de los péptidos están determinadas por los grupos amina y carboxilo terminales y por los grupos ionizables de las cadenas laterales de sus residuos aminoacídicos (–COOH, $–NH_2$, –SH). El pH del medio influye sobre la magnitud y el signo de la carga neta de un péptido de manera análoga a la descripta para aminoácidos. Los péptidos poseen también un punto isoeléctrico, que es el pH en el cual existe un equilibrio entre cargas positivas y negativas.

Péptidos de importancia biológica

En la naturaleza, tanto en vegetales como en animales, existen muchos péptidos que cumplen importantes funciones. Forman un conjunto muy variado en composición y funciones.

Si bien en general están constituidos por aminoácidos unidos como se ha descripto anteriormente, algunos de ellos suelen presentar características peculiares, como uniones peptídicas atípicas, presencia de aminoácidos o derivados de aminoácidos no habituales en proteínas, formación de estructuras cíclicas, etc.

En muchos de ellos se ha podido establecer con precisión la relación entre número y calidad de aminoácidos constituyentes, ordenamiento y disposición espacial de los mismos y actividad biológica de la molécula, ratificando la importancia de los aspectos estructurales de estos compuestos como determinante de su papel funcional.

Uno de los péptidos más ampliamente distribuidos en la naturaleza, pues se encuentra en bacterias, vegetales y animales, es el *glutatión*. Se trata de un tripéptido, formado por ácido glutámico, cisteína y glicina, en ese orden. El ácido glutámico se une por su carboxilo γ o distal, al grupo amina de la cisteína; no se trata de una unión peptídica típica.

Al oxidarse forma un puente disulfuro (–S–S–) con otra molécula de glutatión; la reacción es reversible. La especie reducida posee el grupo –SH libre, mientras en la oxidada, un enlace covalente une a los dos S. El glutatión participa en sistemas enzimáticos de óxido-reducción. Es importante para mantener reducidos grupos –SH de proteínas. En glóbulos rojos y otras células contribuye a prevenir daños oxidativos.

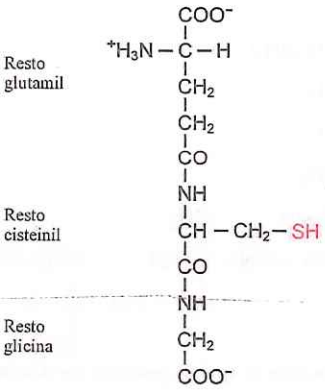
Existen muchos péptidos que cumplen funciones como *hormonas* o *factores liberadores de hormonas*. La tabla 3-1 presenta una lista de algunas hormonas peptídicas.

Otro grupo interesante de péptidos es el de las *encefalinas*, presentes en el sistema nervioso central; producen analgesia al unirse a receptores específicos en células del cerebro.

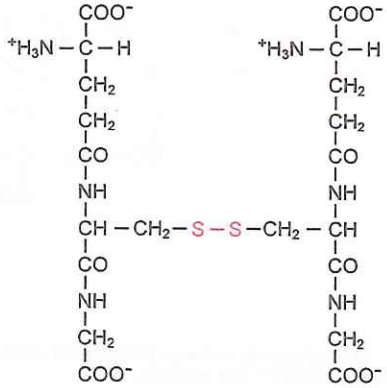
Muchos *antibióticos*, sustancias producidas por microorganismos con efectos tóxicos sobre otros microorganismos, son péptidos o contienen un componente peptídico como parte de su molécula. Algunos de estos antibióticos tienen una estructura cíclica y a menudo contienen D-aminoácidos.

Ciertas especies de hongos producen péptidos altamente tóxicos para el ser humano (amanitina).

Esta breve enumeración da idea de la diversidad de funciones de este tipo de sustancias.



Glutatión reducido
γ-glutamil-cisteinil-glicina



Glutatión oxidado

Tabla 3-1. Algunas hormonas peptídicas.

Nombre	N° de aminoácidos constituyentes	Función
Angiotensina II	8	Hipertensora
Vasopresina	9	Regulación balance hídrico
Oxitocina	9	Estimula contracción uterina
Bradicinina	9	Hipotensora
Calidina	10	Hipotensora
Gastrina I	17	Estimula secreción HCl en estómago
Melanocito estimulante (β MSH)	18	Incrementa depósito de melanina
Secretina	27	Estimula secreción jugo pancreático
Glucagón	29	Hiperglucemiante
Calcitonina	32	Disminuye nivel de Ca en sangre
Colecistoquinina - Pancreozimina	33	Estimula contracción de vesícula biliar y secreción de enzimas pancreáticas
Adrenocorticotrofina	39	Estimula corteza suprarrenal

PROTEÍNAS

Propiedades generales de las proteínas

Propiedades ácido-base

Los conceptos expuestos en la sección de péptidos se aplican también a proteínas. En la cadena polipeptídica, los restos de grupos carboxilo y α-amina interesados en uniones peptídicas no son ionizables. Sólo pueden ionizarse aquellos que se encuentran libres, como el grupo α-amina del extremo N-terminal y el carboxilo del extremo C-terminal. Obviamente, esos dos grupos, por sí solos, no tendrían gran incidencia en las propiedades ácido-base de una macromolécula. La carga eléctrica de una proteína depende de la ionización de los grupos ionizables existentes en las cadenas laterales de los restos aminoacídicos componentes.

La presencia de abundantes residuos de lisina, arginina o histidina en la molécula le otorgan carácter básico. Lisina y arginina poseen grupos amina adicionales que aceptan protones y adquieren carga positiva. Histidina posee el núcleo imidazol, uno de cuyos nitrógenos puede fijar un

protón. Si, en cambio, hay predominio de restos aspartato y glutamato en una proteína, ésta tendrá propiedades acídicas, debidas al carboxilo adicional de esos aminoácidos, capaz de liberar un ion hidrógeno y adquirir carga electronegativa. El grupo fenólico de tirosina y el sulfhidrilo de cisteína tienen carácter débilmente ácido.

La presencia de esos grupos confiere a las proteínas capacidad amortiguadora o *buffer*, ya que captan o liberan protones, según la mayor o menor concentración de iones H^+ en el medio. Sin embargo, en los límites de pH de las células (aproximadamente entre 6,0 y 8,0), sólo los restos de histidina actúan significativamente como amortiguador, pues el pK_a de la función ionizable de su núcleo imidazol (pK_a= 6,0) está más próximo a aquellos valores de pH.

En solución francamente ácida, la mayor parte de los grupos amina libres captan iones hidrógeno, mientras la mayoría de los grupos acídicos están no ionizados. En estas condiciones, la proteína presenta una carga neta positiva.

Por el contrario, en una solución fuertemente alcalina los grupos amina libres ceden protones, quedan no ionizados, y los grupos carboxilo se ionizan. En medio alcalino, la proteína exhibe una carga total o neta de signo negativo.

Si a una dispersión de proteína de pH netamente ácido se le agrega álcali, de modo que el pH suba progresivamente, se producirán cambios en la magnitud y signo de la carga neta, pues los grupos ionizables de la proteína irán liberando iones hidrógeno. La carga positiva inicial de la proteína se reduce, pues los grupos más acídicos (–COOH) ceden sus protones y se hacen electronegativos. En el curso de la adición de álcali, llega un momento en el cual el número de cargas positivas es igual al de cargas negativas. En este instante, la molécula tiene carga total igual a cero. El pH de la dispersión en el cual la carga neta es nula, se conoce como *punto isoeléctrico* y se indica con el símbolo pHi o pI. Si el pH del medio sigue aumentando, también liberan protones los grupos de carácter ácido más débil (–SH, fenol, $-NH_3^+$) y la proteína se torna progresivamente más electronegativa.

Dos proteínas con diferente cantidad de grupos ácidos y básicos libres, tendrán distinta carga neta a un determinado pH. La magnitud de la carga eléctrica de una proteína es proporcional a la diferencia entre el pH del medio y su pHi. Será tanto más electropositiva cuanto más ácido sea el medio con respecto al punto isoeléctrico; por otro lado, la carga electronegativa será tanto mayor cuanto más alcalino sea el pH del medio con relación al pHi de la proteína.

Electroforesis

Si se somete una dispersión de proteína a la acción de un campo eléctrico en un medio cuyo pH sea ácido con respecto al punto isoeléctrico de la proteína, ésta se desplaza hacia el polo negativo o cátodo (gracias a su carga positiva, se comporta como catión). Cuando el pH está por encima del punto isoeléctrico, la proteína migra hacia el polo positivo o ánodo, pues su carga será negativa (se comporta como anión). En el punto isoeléctrico, la proteína no posee carga y permanece inmóvil. La migración por acción de un campo eléctrico se conoce con el nombre de *electroforesis*.

En una mezcla de dos o más proteínas de pHi diferentes, disuelta en un medio de determinado pH, las diferencias entre este pH y el pHi de cada proteína serán distintas y por ello el valor de su carga neta y su velocidad de migración en el campo eléctrico serán también distintos. Este fenómeno constituye el fundamento de una técnica muy utilizada para separación de proteínas: el fraccionamiento electroforético.

El *electroenfoque* es una variante de la electroforesis en la cual el medio en donde se produce la separación cambia su pH en forma gradual (gradiente de pH). Cuando la proteína en migración alcanza la zona de pH correspondiente a su pHi, se detiene.

Masa molecular

Las proteínas difieren considerablemente entre sí en forma, tamaño y masa molecular. Las proteínas más pequeñas tienen alrededor de 6.000 Da, mientras las de mayor tamaño alcanzan varios millones.

Conociendo la masa molecular de una proteína se puede establecer aproximadamente el número de aminoácidos que la integran. Basta dividir su masa por 120, valor promedio para los restos aminoacídicos.

La determinación de la masa molecular se puede realizar por diferentes métodos. Uno de ellos es la *ultracentrifugación*, que emplea un aparato capaz de desarrollar altísimas velocidades y fuerzas centrífugas de 500.000 o más veces la fuerza de la gravedad. Esta técnica permite el estudio de la velocidad de sedimentación de una proteína en solución. La proteína, sometida a esa enorme fuerza centrífuga, tiende a sedimentar con una velocidad proporcional a su masa. Otros métodos, como cromatografía de filtración en geles, electroforesis en geles, centrifugación en gradientes de densidad, etc., resultan más accesibles y permiten conocer con buena aproximación la masa molecular de proteínas.

Solubilidad

Gran parte de las proteínas son solubles en agua o en dispersiones acuosas. La estabilidad de éstas se debe a varios factores. Uno de los más importantes es la propiedad de las partículas dispersas de interactuar con moléculas de solventes polares como el agua, que forman una cubierta o aureola denominada capa de *solvatación* (de hidratación cuando el solvente es agua). Gracias a su alta constante dieléctrica, el agua aísla entre sí a grupos de cargas opuestas en diferentes moléculas e impide que éstas tiendan a agregarse y precipitar.

La presencia de grupos funcionales ionizados, como $-NH_3^+$ y $-COO^-$ y de otros grupos polares (–OH, –SH, =NH) atrae moléculas de agua, que se orientan a su alrededor, formando una capa de hidratación.

Las diferencias de solubilidad entre distintas proteínas pueden deberse a su diverso grado de hidratación, determinado por el número de grupos polares. Es necesario tener en cuenta también la presencia de grupos no polares que repelen el agua (núcleos aromáticos, cadenas alifáticas), cuyo número y distribución influyen en el grado de solvatación.

Otro factor de estabilidad es la carga eléctrica neta o total de la molécula, de igual signo para todas las partículas de una misma proteína y, por lo tanto, origina fuerzas de rechazo mutuo e impide su agrupamiento y precipitación. El valor de la carga neta puede ser diferente para distintas proteínas en similares condiciones de medio y ello explica su diferente grado de solubilidad. Esta solubilidad varía con el pH, la temperatura y la presencia de sales inorgánicas o solventes no polares en el medio. La conducta frente a estos factores es distinta para diferentes proteínas, lo cual se aprovecha en métodos de fraccionamiento, tales como la precipitación selectiva mediante agregado de sales o solventes no polares en diversas condiciones de concentración, pH y temperatura.

Efecto del pH. El pH es un factor importante en la solubilidad de una proteína por cuanto de él depende la magnitud de la carga eléctrica neta de la molécula. La carga eléctrica total de una molécula proteínica es nula en su punto isoeléctrico y, en consecuencia, la solubilidad será mínima a ese pH. Esta propiedad puede ser utilizada para separar proteínas de una mezcla modificando el pH hacia valores en los cuales una de ellas tiende a precipitar, mientras las restantes, de diferente pHi, no son afectadas (separación isoeléctrica).

En el pHi la carga neta es cero, las fuerzas de repulsión intermoleculares desaparecen y la precipitación puede producirse directamente o luego de la adición de agentes que actúen sobre la capa de solvatación.

Efecto de sales. A bajas concentraciones, las sales favorecen la solubilidad de muchas proteínas pues los iones inorgánicos interaccionan con los grupos ionizados de las moléculas proteínicas. El fenómeno es más notable en proteínas con marcado carácter dipolar, es decir, en aquellas en cuya molécula las cargas de signo contrario se distribuyen asimétricamente. La adición de sales reduce la atracción electrostática entre esas moléculas y favorece su dispersión. Sin embargo, a medida que se aumenta la concentración de sal, sus iones ejercen atracción sobre las moléculas de agua de la capa de solvatación y tienden a despojar a la proteína de su cubierta hidratante. En consecuencia, su solubilidad decrece. Cuando la concentración de sal alcanza cierto valor, estos efectos se hacen suficientemente intensos como para provocar la precipitación de la proteína.

Los sulfatos de amonio, sodio o magnesio, y el hiposulfito de sodio son, entre otras, las sales más utilizadas para obtener precipitaciones selectivas. En efecto, cuando se agrega una de estas sales a mezclas de proteínas, se puede obtener precipitación de las diferentes fracciones a medida que se alcanzan distintas concentraciones de sal en el medio; a este método de separación se lo llama *fraccionamiento salino*. Estos métodos resultan convenientes, pues las proteínas no son alteradas y pueden ser redisueltas sin mengua de sus propiedades.

Efecto de solventes poco polares. El agregado de solventes poco polares (etanol, acetona, etc.) a dispersiones de proteínas disminuye su solubilidad y produce precipitación cuando la concentración del solvente alcanza ciertos valores, variables según la proteína considerada. La precipitación se acompaña de alteración de la proteína (desnaturalización), a menos que se trabaje a temperaturas muy bajas. Si a una mezcla compleja de proteínas se le agrega etanol en forma paulatina, se van creando condiciones de solubilidad diferentes para distintas proteínas y se obtiene precipitación selectiva de las mismas (fraccionamiento alcohólico). El etanol tiene una constante dieléctrica menor que el agua; por esta razón, disminuye el poder aislante del medio, lo cual permite la atracción de grupos con carga opuesta y favorece la producción de agrupamientos moleculares que tienden a precipitar. Para lograr la precipitación fraccionada es necesario realizar cuidadosos ajustes de temperatura y pH a fin de evitar la desnaturalización y acentuar el efecto de disminución de la carga total de las moléculas de proteína.

Diálisis - Ultrafiltración

La mayoría de los sistemas biológicos son mezclas complejas que contienen solutos de pequeña masa molecular junto con macromoléculas. Mediante un proceso llamado *diálisis*, es posible separar las moléculas pequeñas. Se utilizan membranas porosas, como celofán y otros materiales sintéticos, que actúan a la manera de un tamiz: permiten el paso de agua y moléculas de bajo peso y retienen macromoléculas. A este tipo de membranas se las llama *semipermeables*.

Si se coloca dentro de un saco de celofán una dispersión compleja como suero sanguíneo y se lo sumerge en agua pura, van pasando al exterior, a través de la membrana, los solutos de masa pequeña (iones inorgánicos, glucosa, urea, etc.), mientras en el saco dializador quedan encerradas las proteínas, para las cuales la membrana es impermeable. Renovando repetidamente el agua que rodea el saco de diálisis, se llega a extraer la casi totalidad de los solutos difusibles originalmente presentes en la muestra de suero.

Una variante de este método es la *ultrafiltración*, en la cual se utiliza un sistema filtrante, dotado de una placa porosa que actúa como membrana semipermeable. Después de agregar al filtro la mezcla compleja, se aplica una diferencia de presión a ambos lados de la membrana, ya sea aumentando la presión sobre la mezcla, o realizando el vacío del otro lado de la placa filtrante. Pasarán a través del filtro agua y sustancias de pequeña masa. Este método, además de separar las moléculas pequeñas, permite concentrar las macromoléculas por sustracción del solvente, lo cual es útil cuando se desea estudiar proteínas en una dispersión en la cual se encuentran muy diluidas.

Forma molecular

Cada proteína tiene, al estado natural, una forma molecular característica. De acuerdo con esto se consideran dos grandes categorías: *globulares* y *fibrosas*.

Proteínas globulares. Son aquellas en las cuales la molécula se pliega sobre sí misma para formar un conjunto compacto semejante a un esferoide u ovoide, con sus tres ejes de similar longitud. En general, son proteínas de gran actividad funcional; enzimas, anticuerpos, hormonas, hemoglobina, etc., pertenecen a este grupo. Son solubles en medios acuosos.

Proteínas fibrilares o fibrosas. En ellas las cadenas polipeptídicas se ordenan paralelamente, formando fibras o láminas extendidas, en las cuales el eje longitudinal predomina notoriamente sobre los transversales. En general, son poco solubles o insolubles en agua y participan en la constitución de estructuras de sostén, como fibras del tejido conjuntivo y otras formaciones tisulares de gran resistencia física.

Estructura molecular

La estructura de proteínas es muy compleja, razón por la cual resulta conveniente describirla en distintos niveles de organización:

1) *Estructura primaria*. Se refiere al número e identidad de los aminoácidos que componen la molécula y al ordenamiento o secuencia de esas unidades en la cadena polipeptídica. La unión peptídica sólo permite formar estructuras lineales; por ello, las cadenas no presentan ramificaciones.

2) *Estructura secundaria*. Disposición espacial regular, repetitiva, que adopta la cadena polipeptídica, generalmente mantenida por puentes de hidrógeno.

3) *Estructura terciaria*. Arquitectura tridimensional completa de la proteína.

4) *Estructura cuaternaria*. Se aplica sólo a proteínas constituidas por dos o más cadenas polipeptídicas y refiere a la disposición espacial de esas cadenas y a los enlaces que se establecen entre ellas.

Estructura primaria

Cuando se somete una proteína a hidrólisis completa, quedan en libertad los aminoácidos constituyentes, los cuales pueden ser entonces identificados y su cantidad determinada. Por ejemplo, la insulina bovina, pequeña proteína de masa próxima a 6.000 Da, está constituida por 3 unidades de alanina, 1 de arginina, 3 de asparragina, 6 de cisteína, 3 de fenilalanina, 4 de glicina, 4 de ácido glutámico, 3 de glutamina, 2 de histidina, 1 de isoleucina, 6 de leucina, 1 de lisina, 1 de prolina, 3 de serina, 4 de tirosina, 1 de treonina y 5 de valina. Es ésta la composición global de aminoácidos, información de interés sin duda, pero que nada dice acerca de la manera en la cual las unidades se disponen en la cadena o, en otros términos, sobre su *secuencia* u ordenamiento. A esta secuencia nos referimos al hablar de estructura primaria.

Cada proteína se caracteriza por poseer una composición definida de aminoácidos y especialmente por la secuencia según la cual las unidades se ordenan. El ensamble de los aminoácidos en cada una de las proteínas constituyentes de los

seres vivos se realiza según instrucciones contenidas en los genes. El orden de las unidades que forman el material genético (nucleótidos del ADN) puede asimilarse a un "mensaje en código" que indica la secuencia en la cual deben ir insertándose los aminoácidos cuando se sintetiza la proteína (ver pág. 439).

Veinte aminoácidos diferentes pueden constituir, al asociarse mediante enlaces peptídicos, moléculas de proteínas de cientos y hasta miles de unidades; el número de asociaciones diferentes teóricamente posible es enorme. Para dar una idea de la magnitud de esos números, basta calcular las combinaciones distintas que se pueden obtener con los veinte aminoácidos, formando cadenas en las cuales sólo se presente una vez cada uno de ellos. El resultado es $2 \cdot 10^{18}$ variedades diferentes. ¡Y eso es para un icosapéptido (20 aminoácidos), molécula muy pequeña comparada con el promedio de las proteínas (más de 300 aminoácidos)! Si se aumenta el número total de unidades y se da la posibilidad de repetir cualquiera de ellas en distintas proporciones, puede obtenerse una cantidad casi infinita de polímeros diferentes. Sin embargo, debe aclararse que no todas las combinaciones posibles se dan en la naturaleza, porque muchas de ellas no tienen capacidad funcional alguna. No obstante, es evidente el enorme potencial de variación molecular implícito en la estructura de proteínas.

Determinación de la estructura primaria. Establecer la estructura primaria es un paso fundamental en el estudio de moléculas proteínicas, razón por la cual se han invertido muchos esfuerzos con ese propósito.

La primera proteína cuya secuencia se conoció con exactitud fue la insulina bovina, cuya composición global ya se ha indicado. Este importantísimo hito de la bioquímica moderna se debe al investigador inglés Sanger, quien en la década del 50 desarrolló un método basado en la reacción con 1-flúor-2,4-dinitrobenceno. En medio alcalino, este compuesto reacciona con el grupo α-amina terminal de las cadenas peptídicas. Después de hidrólisis ácida del péptido, se identifica por cromatografía el resto aminoacídico N-terminal, pues es el único que se encuentra como dinitrofenil derivado.

Otros reactivos utilizados para identificar residuos N-terminales son el cloruro de dansilo, el cloruro de dabsilo y el fenilisotiocianato. Este último fue propuesto por Edman para determinar la secuencia. La técnica, conocida como *degradación de Edman*, tiene ventajas sobre las anteriormente usadas porque el derivado del fenilisotiocianato con el aminoácido N-terminal es separado por hidrólisis ácida suave, sin afectar las uniones peptídicas del resto de la cadena. El método permite identificar ordenadamente, uno a uno, los aminoácidos integrantes de un polipéptido. En la práctica se lo aplica a fragmentos resultantes del tratamiento de la proteína con reactivos químicos y enzimas que producen hidrólisis selectiva de determinadas uniones peptídicas. Una vez resuelta la secuencia de aminoácidos de los distintos segmentos, es posible conocer la disposición de esos trozos en la molécula original y establecer la estructura primaria de la proteína completa. Existen equipos secuenciadores que realizan automáticamente la determinación de la estructura primaria de polipéptidos de regular tamaño. Actualmente se emplean métodos indirectos, utilizando técnicas de ingeniería genética. Se aísla el gen que contiene la información para sintetizar la proteína, se determina en él la secuencia de nucleótidos y, a partir de ella, se deduce la estructura primaria de la proteína. Con los métodos hoy disponibles, resulta más fácil establecer la secuencia de nucleótidos en el ADN que la de aminoácidos en un polipéptido. Se conoce la secuencia de aminoácidos de muchos miles de moléculas polipeptídicas y el número sigue aumentando rápidamente.

Es también posible sintetizar químicamente polipéptidos. El método más efectivo es la síntesis en fase sólida, consistente en fijar el aminoácido C-terminal de la cadena a un soporte adecuado (resina sintética); luego se hacen reaccionar los aminoácidos uno a uno para formar los enlaces peptídicos con la secuencia deseada. Merrifield, creador del método, logró sintetizar con él una enzima de 124 residuos, la ribonucleasa.

Importancia de la estructura primaria de proteínas

La secuencia de aminoácidos de una proteína es el principal determinante de su conformación, propiedades y características funcionales.

Los requerimientos estructurales para que una proteína cumpla correctamente su papel fisiológico son muy rigurosos. No sólo es necesario mantener el número y tipo de aminoácidos constituyentes; además, cada uno de ellos debe ocupar una posición definida en la cadena. Alteraciones en ese ordenamiento, o sustituciones de aminoácidos, pueden afectar la capacidad funcional de la molécula y hasta tornarla inútil.

Como se verá más adelante, las células sintetizan sus proteínas ensamblando aminoácidos según instrucciones precisas. Estas instrucciones

están contenidas en el ácido desoxirribonucleico (ADN) que forma el material genético.

Modificaciones de ese material (mutaciones) pueden conducir a "errores" en la síntesis y a la producción de proteínas anormales. Existe un gran grupo de enfermedades hereditarias que reconoce este origen.

En general, la estructura primaria de una proteína encargada de una función determinada es idéntica en todos los individuos de la misma especie, pero presenta diferencias con la proteína homóloga de otras especies. Sin embargo, existen proteínas que difieren aun entre individuos de una especie. Estas diferencias inter e intraespecíficas tienen gran interés desde el punto de vista médico. El organismo humano, y el de muchos animales, tiene capacidad para detectar la entrada de proteínas extrañas, distintas en estructura primaria de las constituyentes de sus propios tejidos, e iniciar una respuesta llamada *reacción inmunitaria*. Esta reacción lleva a la producción de *anticuerpos* específicos, con capacidad para unirse a la proteína "intrusa" y promover su destrucción. Este tipo de respuesta es uno de los mecanismos de defensa natural contra agentes extraños (ver pág. 662 y siguientes).

Proteínas como hemoglobina, que cumplen la misma función en distintos animales, presentan diferencias interespecíficas en su estructura primaria. Sin embargo, todas las hemoglobinas exhiben notables semejanzas: poseen cadenas polipeptídicas de longitud idéntica o casi idéntica; en muchas posiciones de la cadena coinciden los mismos restos aminoacídicos; su conformación general es muy similar, etc. Estas similitudes sugieren que las hemoglobinas de distintas especies derivaron de un gen ancestral común. La diversificación del material genético, por mutaciones sucesivas en el curso de la evolución, ha generado la variedad existente.

En este sentido, tiene particular interés el análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos en proteínas homólogas presentes en organismos de diversos niveles de la escala biológica. Una proteína muy estudiada desde este punto de vista es el *citocromo c*, ampliamente distribuido en la naturaleza. Se ha determinado la secuencia de esta molécula, formada por 104 aminoácidos, en numerosas especies. En todas ellas se comprueba la existencia de 27 posiciones ocupadas siempre por los mismos aminoácidos. Estos sitios invariables son los más estrechamente relacionados con la función. En las restantes posiciones puede haber diferencias y éstas son tanto más marcadas cuanto más alejadas en la escala filogenética están las especies a las cuales pertenecen. Por ejemplo, el citocromo c de caballo difiere del de levadura en 48 restos aminoacídicos, mientras el de pollo y el de pato tienen sólo 2 aminoácidos distintos. Con los datos de diferencias en la secuencia de proteínas se construyen árboles filogenéticos que permiten inferir el curso de su evolución y hasta estimar la época probable en la cual distintos organismos comenzaron a diferenciarse de un antecesor común.

Estructura secundaria

La disposición espacial que adopta la cadena polipeptídica depende de la orientación de los enlaces entre los átomos –C–N–Cα– que se suceden en forma repetitiva constituyendo la "columna vertebral" de la proteína. El enlace peptídico posee un carácter intermedio entre el de un enlace simple y uno doble, lo cual otorga cierta rigidez a la unión C–N y no permite la rotación libre de esos átomos. Esta limitación tiene varias consecuencias: a) Los cuatro átomos directamente vinculados con el enlace peptídico (C, O, N e H) y los dos carbonos α unidos al C y al N se encuentran en un mismo plano (fig. 3-9). b) El O del carbonilo (=CO) y el H unido al nitrógeno quedan en posición *trans*, al igual que los dos carbonos α. c) La cadena lateral (R) y el H unidos a los carbonos α se proyectan fuera del plano que contiene a los otros átomos.

Las uniones de los carbonos α (Cα-C y N-Cα) son simples (tipo sigma) y permiten libre rotación (fig. 3-10). En consecuencia, la orientación que adopten esos enlaces determinará la disposición de la cadena en el espacio.

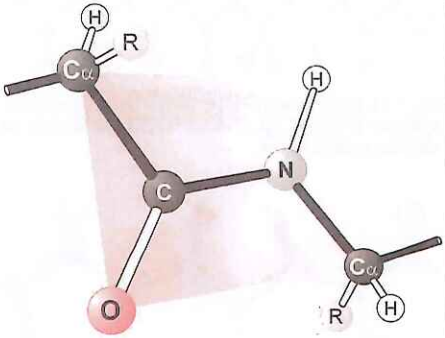


Fig. 3-9. Modelo molecular de una unión peptídica. Los cuatro átomos directamente vinculados al enlace peptídico (C, O, N e H) se encuentran en el mismo plano, al igual que los Cα unidos al C y al N. Los Cα pueden rotar libremente.

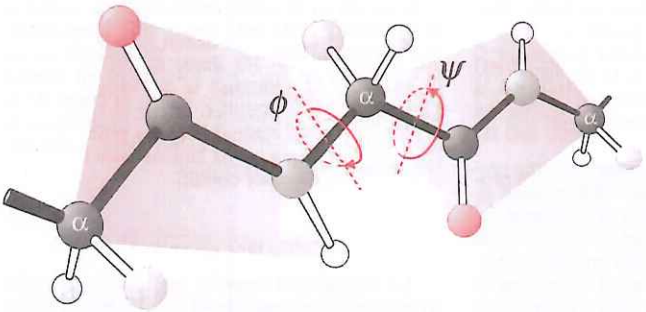


Fig. 3-10. Rotación de los enlaces en uniones peptídicas. Sólo pueden rotar las uniones N-Cα y C-Cα; los ángulos de rotación son designados ϕ (phi) y ψ (psi) respectivamente. Se muestra la conformación extendida, en la cual ϕ y ψ tienen un valor de +180°. C: negro, O: rojo, N: gris, H: blanco, cadenas laterales: rosado.

Uno de los métodos que más ha contribuido al conocimiento de la estructura de proteínas ha sido el de *difracción de rayos X*. El estudio mediante rayos X de cristales de proteínas altamente purificadas permite obtener diagramas de difracción, en los cuales es posible reconocer la disposición espacial de los átomos que componen la molécula. Otras técnicas utilizadas en el análisis estructural de proteínas son dispersión óptica rotatoria, dicroísmo circular, resonancia nuclear magnética y espectrometría de masa. La descripción de estos métodos escapa a nuestros propósitos.

La figura 3-11 muestra una representación simplificada de la cadena polipeptídica; en realidad, el esqueleto básico de la cadena es mejor esquematizado por una sucesión de planos articulados a nivel de los carbonos α, que pueden formar distintos ángulos entre sí (fig. 3-12).

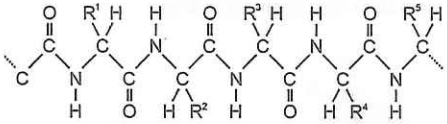


Fig. 3-11. Representación simplificada de un trozo de polipéptido. R^1, R^2, R^3, etc., indican las cadenas laterales de residuos aminoacídicos.

A fines de la década del 40, Pauling y Corey realizaron un análisis de longitudes de enlaces y de los ángulos formados por los mismos. Estudios mediante difracción de rayos X confirmaron los modelos teóricos y permitieron a esos autores proponer dos tipos de estructuras periódicas, repetitivas, para las proteínas: la *hélice* α y la hoja plegada o *lámina* β (las letras α y β sólo indican el orden en el cual ambas estructuras fueron propuestas por los investigadores mencionados).

Hélice α. Frecuentemente la disposición de la cadena determina su enrollamiento sobre un eje central, como si estuviese envolviendo un cilindro (fig. 3-13). Una vuelta completa de la hélice cubre una distancia de 0,54 nm a lo largo del eje y requiere 3,6 restos aminoacídicos. Esto significa que cada residuo abarca una altura de 0,15 nm y un ángulo de 100° alrededor del eje. El giro se hace en el sentido de las agujas del reloj y por ello se dice que la hélice es dextrógira o derecha. Este tipo de estructura secundaria se mantiene por uniones *puente de hidrógeno*.

El puente de hidrógeno se establece entre dos átomos electronegativos. En la cadena polipeptídica, el hidrógeno unido al N de un resto amina es atraído por el oxígeno de un grupo carbonilo (fig. 3-14).

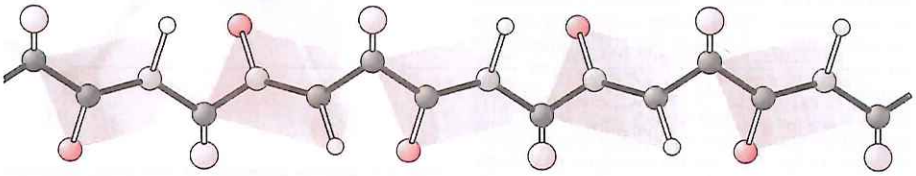


Fig. 3-12. Representación esquemática de un trozo de cadena polipeptídica extendida, en la cual se indican los planos que comprenden a todos los átomos interesados en cada unión peptídica. Carbono: negro; oxígeno: rojo; nitrógeno: gris; hidrógeno: blanco, cadenas laterales: rosado.

Fig. 3-13. Representación esquemática de un segmento de cadena polipeptídica enrollada en hélice α. R indica cadenas laterales de restos aminoacídicos. Las líneas de puntos rojos representan los puentes de hidrógeno que estabilizan la hélice. No se muestran elementos situados detrás de la hélice.

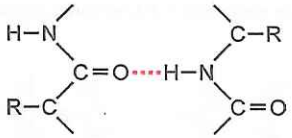


Fig. 3-14. Puente de hidrógeno (línea de puntos en rojo) en la cadena peptídica.

En la hélice, cada grupo =CO puede formar un puente de este tipo con el grupo =NH del resto aminoacídico situado cuatro lugares más adelante en la cadena, cuando ésta ha dado una vuelta completa y ambos grupos quedan vecinos (figs. 3-13, 3-15). La disposición *trans* de esos grupos permite la formación del puente. Aunque aisladamente el puente de hidrógeno es débil, la existencia de gran cantidad de ellos a lo largo de la hélice hace de ésta una estructura muy estable y compacta.

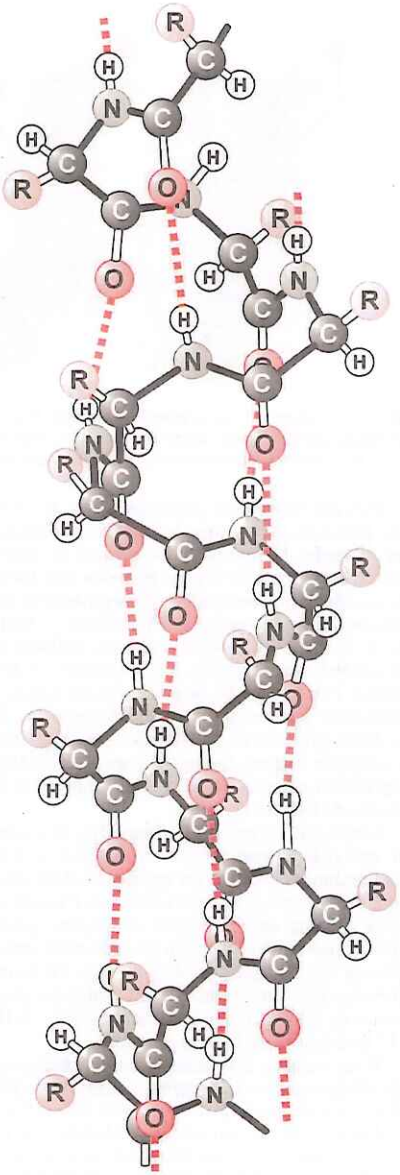


Fig. 3-15. Modelo molecular de esferas y varillas de una hélice α. R representa cadenas laterales de los restos aminoacídicos. Las líneas de puntos rojos indican los puentes de hidrógeno que estabilizan la hélice (imitado de Corey y Pauling).

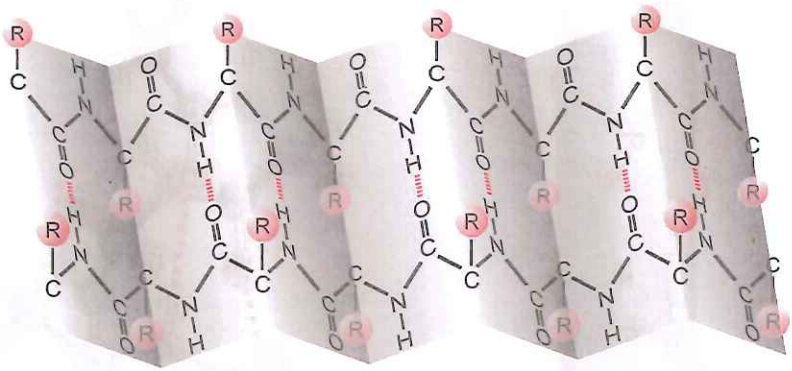


Fig. 3-16. Esquema de un segmento de lámina β formada por dos cadenas polipeptídicas apareadas. Los enlaces de hidrógeno que mantienen esta estructura están indicados en trazo cortado en rojo. Las cadenas laterales de aminoácidos (R) se encuentran alternativamente por arriba y por debajo de la lámina plegada.

Para que la hélice α pueda formarse, la estructura primaria debe cumplir ciertas condiciones. Por ejemplo, la presencia de prolina es incompatible con la hélice α pues provoca una torsión de la cadena que interrumpe la regularidad en la orientación de los enlaces. El carbono α, incluido en el núcleo pirrolidina de este aminoácido, no puede rotar, forzando una posición fija en la cadena. Por otra parte, la presencia de restos voluminosos, con carga (como los de arginina, lisina, ácido glutámico), localizados próximos entre sí, originan fuerzas electrostáticas que afectan la disposición espacial de la cadena e impiden la formación de hélices α.

Lámina β. La cadena polipeptídica se encuentra aquí más extendida que en la hélice α. Cada resto aminoácido cubre un espacio de 0,35 nm en lugar de 0,15 nm como en la hélice α. Cuando dos o más cadenas así extendidas se aparean, pueden establecerse entre ellas puentes de H entre grupos =NH de una con grupos =CO de otra. Se forman así estructuras laminares que presentan un plegamiento en zigzag, como muestran las figs. 3-16 y 3-17 (estructura en *lámina plegada*).

Si las cadenas apareadas tienen el mismo sentido (N-terminal → C-terminal), se las llama paralelas; si marchan en direcciones opuestas, son antiparalelas. A veces, una cadena puede hacer un giro y volver sobre sí misma, formando una horquilla. En este caso el apareamiento será antiparalelo.

En ciertas proteínas se presentan otros tipos de estructura secundaria. Una de ellas es la hélice del colágeno, que se considerará más adelante.

Disposición al azar. Puede suceder que la cadena polipeptídica no posea una estructura regular, en cuyo caso se habla de *disposición* o *enrollamiento al azar*. Esto no significa, sin embargo, que la cadena siga una orientación totalmente aleatoria; en general, se tiende a adoptar la disposición espacial termodinámicamente más favorable.

En una misma molécula suelen encontrarse distintos tipos de estructura secundaria. Una proteína globular, por ejemplo, no podría estar constituida en su totalidad por una hélice α, pues en ese caso habría un gran predominio del eje longitudinal y su forma correspondería a una proteína fibrosa. Frecuentemente se encuentran hélices α en varios segmentos de una molécula, conectadas entre sí por trozos de disposición al azar. Las proteínas globulares presentan habitualmente segmentos en

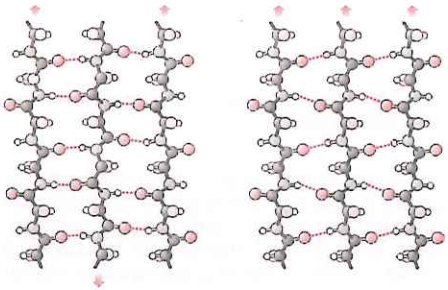


Fig. 3-17. Modelo molecular de esferas y varillas de dos tipos de lámina β. A la izquierda, cadenas antiparalelas; a la derecha, paralelas. Las flechas indican la dirección N-terminal → C-terminal. Carbono: esferas negras; cadenas laterales: rosadas; oxígeno: rojas; nitrógeno: grises; hidrógeno: blancas (imitado de Pauling).

hélice, en lámina plegada y al azar (fig. 3-20) y en algunos casos toda la molécula se dispone al azar. Las proteínas fibrosas presentan exclusivamente estructuras en hélice o en lámina β.

Estructura terciaria

La arquitectura total de la molécula proteínica determina una conformación tridimensional característica para cada una de ellas. De acuerdo con la forma final se clasifica a las proteínas en globulares y fibrosas.

En las proteínas *fibrosas* o *fibrilares* bastan las estructuras secundarias descriptas para explicar su conformación. Toda la molécula puede disponerse en hélice, o en lámina plegada, lo cual determina franco predominio del eje longitudinal sobre los transversales.

En las proteínas *globulares*, en cambio, si bien pueden existir porciones de la cadena que adoptan estructuras en hélice α o en lámina β, son necesarios segmentos dispuestos al azar entre las zonas estructuradas para permitir las acodaduras y plegamientos indispensables a fin de alcanzar conformación esferoidal.

La disposición tridimensional finalmente adoptada por la molécula no es fortuita. Se mantiene gracias a uniones e interacciones de las cadenas laterales de residuos aminoacídicos del polipéptido. También es necesario tener en cuenta factores de orden termodinámico. La forma más estable es aquella de menor energía libre.

Las fuerzas responsables del mantenimiento de la estructura terciaria son de distinto tipo:

1) *Fuerzas de atracción o repulsión electrostática*. Grupos con carga eléctrica, como los $-NH_3^+$ de lisina y arginina, pueden enfrentarse con grupos de signo opuesto ($-COO^-$ de aspartato y glutamato), formando enlaces iónicos, de tipo salino, capaces de mantener aproximadas zonas distantes de la cadena. Si los grupos tienen igual signo, el efecto será de repulsión y alejamiento de los sectores correspondientes.

2) *Puentes de hidrógeno*. El oxígeno del carbonilo de un carboxilo libre en restos aspártico o glutámico, o un nitrógeno del núcleo imidazol de histidina, pueden atraer el hidrógeno de grupos –OH de serina, treonina o tirosina, estableciendo puentes de H. Nótese que se trata de uniones entre grupos distintos de los que estabilizan las estructuras secundarias hélice α o lámina β.

3) *Puentes disulfuro*. El enfrentamiento de los grupos sulfhidrilos (–SH) de dos residuos cisteína puede determinar, por oxidación, el establecimiento de una unión covalente –S–S–, o puente disulfuro. Este tipo de enlace, frecuente en la estructura de proteínas, fija en una relación de vecindad inmediata dos zonas a veces muy alejadas en la secuencia.

4) *Interacciones de cadenas laterales hidrofóbicas*: La presencia de restos aminoacídicos hidrofóbicos como los de leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, triptófano, etc., tiene gran importancia como determinante de la con-

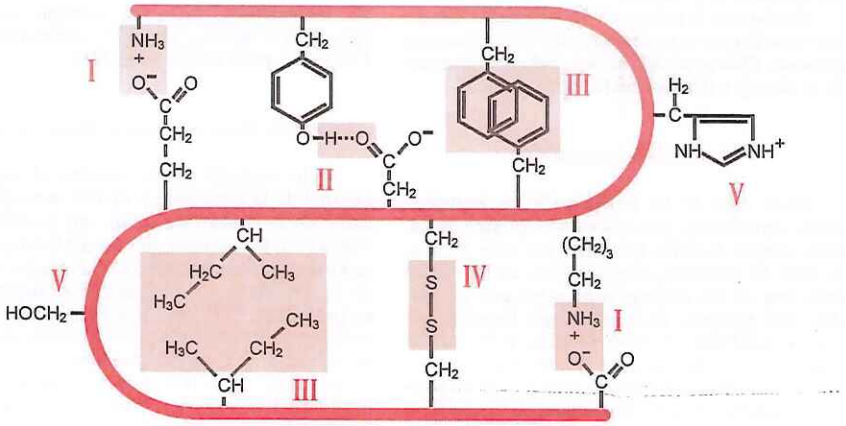


Fig. 3-18. Fuerzas que mantienen la estructura terciaria de una cadena polipeptídica. I. Atracciones electrostáticas. II. Puente de hidrógeno. III. Interacciones de cadenas o grupos no polares. IV. Puente disulfuro. V. Grupos hidrofílicos orientados hacia el exterior (modificado de Anfinsen).

formación de proteínas en solución acuosa. Las cadenas laterales apolares tienden a alejarse del contacto con el agua y provocan plegamientos que agrupan restos hidrófobos en el interior de la molécula (interacciones hidrofóbicas).

5) *Papel de cadenas laterales hidrófilas*. Los restos de aminoácidos con grupos hidrófilos ($-COO^-$, $-NH_3^+$, $-OH$, etc.) tienden a ubicarse hacia el exterior de la molécula, en contacto con el solvente polar.

Cuando la proteína se encuentra en un entorno de moléculas apolares, como sucede con las que atraviesan la doble capa lipídica de membranas, la disposición se invierte; los aminoácidos de cadena hidrófoba son los que interaccionan con el medio que los rodea.

6) *Fuerzas de van der Waals*. La nube electrónica de cada átomo sufre fluctuaciones que generan asimetrías en la distribución de cargas eléctricas y generan dipolos transitorios. Cuando dos átomos no unidos entre sí por enlaces covalentes se aproximan a una distancia suficientemente pequeña (0,3 a 0,4 nm), el dipolo de un átomo induce un dipolo opuesto en el otro y ello determina atracción mutua. Estas interacciones, también llamadas *fuerzas de London*, son muy débiles, pero adquieren significación cuando un número grande de átomos pueden aparearse y acercarse lo suficiente al mismo tiempo.

Cada átomo tiene un radio de van der Waals característico, que determina cuán cerca permitirá a otro aproximarse. A distancias menores predomina la repulsión entre las cargas negativas de los orbitales electrónicos.

El esquema de la figura 3-18 resume las fuerzas que contribuyen al mantenimiento de la estructura terciaria. Ellas sostienen las acodaduras y pliegues de la cadena y determinan la forma general.

Estructura cuaternaria

Hasta aquí se ha hablado de las proteínas como constituidas por una cadena polipeptídica. Pero existen muchas formadas por más de una; se trata de proteínas *oligoméricas*, en las cuales cada una de las cadenas representa una *subunidad*. Por ejemplo, la insulina está formada por dos subunidades, la hemoglobina y la enzima lactato deshidrogenasa, por cuatro, etc.

La estructura cuaternaria refiere a la disposición espacial de las subunidades polipeptídicas constituyentes de esas moléculas compuestas. Las fuerzas responsables de mantener en posición a las diferentes subunidades son puentes de hidrógeno, atracciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, puentes disulfuro entre cisteínas, etc. Es

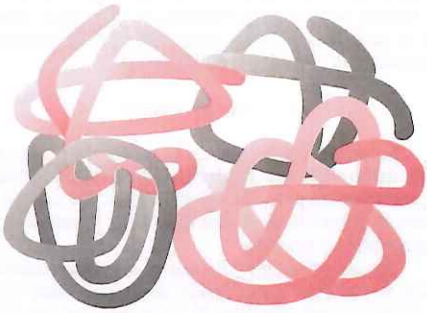


Fig. 3-19. Estructura cuaternaria. Se muestra esquemáticamente la disposición de subunidades polipeptídicas para formar una proteína oligomérica (tetramérica en el caso representado).

obvio que sólo las proteínas cuyas moléculas están formadas por varias subunidades polipeptídicas pueden presentar estructura cuaternaria (fig. 3-19).

Complejos multimoleculares

En otro nivel de organización deben considerarse las interacciones de diferentes proteínas entre sí, o con otro tipo de compuestos, para formar complejos multimoleculares que desempeñan funciones altamente especializadas. Algunos de estos complejos representan verdaderas "máquinas moleculares" (ver, por ejemplo, complejo F_1F_0 o ATP sintasa, pág. 177; ribosomas, págs. 128 y 447; proteasoma, pág. 328).

Consideraciones sobre estructura de proteínas

De lo expuesto puede inferirse el papel primordial de la estructura primaria como determinante de la conformación de una proteína. Las fuerzas e interacciones que mantienen las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria resultan de la presencia de determinados aminoácidos en posiciones definidas. Por esta razón, algunos cambios en la secuencia pueden causar profundas modificaciones conformacionales.

Al tratar estructura primaria, se destacó la posibilidad teórica de obtener un número casi infinito de secuencias diferentes ensamblando aminoácidos al azar. Después de haber analizado otros aspectos estructurales, como los referidos a la conformación de la molécula, es necesario aceptar que no todas las secuencias teóricamente

posibles son viables; la formación de hélices α o de láminas β tiene requerimientos en relación con la composición en aminoácidos de la cadena. Si se disponen unidades al azar se puede comprobar que no todos los polipéptidos posibles son capaces de formar estructuras secundarias y terciarias estables, o alcanzar conformaciones compatibles con el ejercicio de una función determinada.

Las moléculas de proteínas presentes en los seres vivos actuales son el fruto de una lenta evolución, durante la cual se han ido seleccionando las secuencias más aptas para el cumplimiento de un papel fisiológico dado. Entonces, el repertorio de combinaciones idóneas, aunque vastísimo, resulta menos variado de lo previsible a partir de combinaciones al azar.

Frente a la diversidad del mundo biológico, debe reconocerse la existencia de proteínas homólogas, con caracteres comunes, en moléculas de muy distinto origen. Se ha mencionado el caso del citocromo c y pueden citarse muchos otros de proteínas que cumplen igual función en especies muy alejadas entre sí. Aun cuando posean diferencias de mayor o menor cuantía en sus secuencias, presentan notables similitudes en estructuras secundaria y terciaria. Es evidente que, en el curso de la evolución, se han conservado las posiciones críticas, mientras los cambios operados en otros aminoácidos no han modificado las propiedades fisicoquímicas como para alterar significativamente la conformación total de la molécula.

El conocimiento de las secuencias de miles de proteínas ha permitido realizar análisis comparativos y comprobar la existencia de elementos estructurales comunes. Especialmente en proteínas globulares, se encuentran segmentos de la molécula constituidos por asociaciones de hélices α y láminas β (figs. 3-20 y 3-21) en disposiciones relativas más o menos estables. Estos conjuntos estructurales se comportan como una unidad y reciben el nombre de *dominios*. Un dominio es un sector de la molécula con estructuras y plegamientos definidos, frecuentemente relacionado con misiones funcionales específicas. En el campo de los dominios, el proceso de la evolución ha sido conservador, procurando mantener invariables las conformaciones que han probado ser eficientes.

Se ha reconocido la existencia, en un mismo individuo, de familias de proteínas con rasgos estructurales comunes y funciones semejantes, aunque no idénticas. Por ejemplo, la familia de receptores de esteroides, de inmunoglobulinas, de serina-proteasas, etc. Cada una de estas familias tendría un origen genético común. Un gen ancestral, por duplicaciones sucesivas y posterior diferenciación independiente, ha generado los distintos miembros de cada familia.

Destacaremos aquí otro hecho relacionado con la estructura: la molécula proteínica no constituye un conjunto rígido e indeformable. Por el contrario, muestra flexibilidad y plasticidad, esenciales para su adecuado comportamiento funcional. Más adelante se presentarán ejemplos que apoyan esta afirmación.

Según se ha indicado, la estructura primaria es la principal responsable de la conformación finalmente adoptada por la molécula de proteína. Las estructuras secundaria y terciaria son el resultado de interacciones y uniones de diverso tipo entre grupos funcionales de residuos aminoacídi-

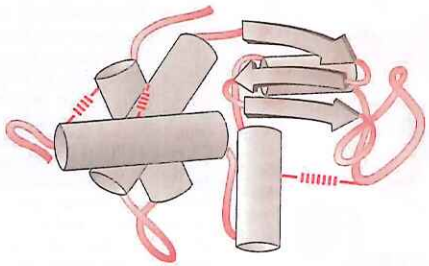


Fig. 3-20. Molécula de una proteína formada por segmentos de hélice α y de lámina plegada β unidos por trozos de disposición al azar. En el esquema se representan las hélices α como cilindros y los segmentos que forman la lámina β, como flechas planas. El conjunto corresponde a una proteína globular (lisozima).

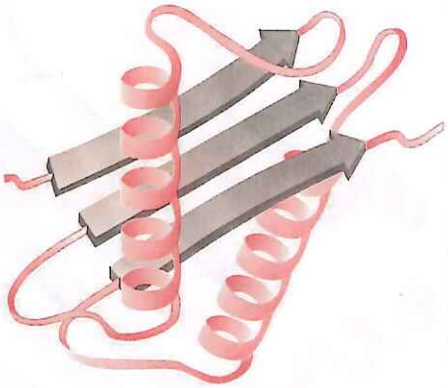


Fig. 3-21. Esquema de un dominio formado por la combinación de hélices α (representadas como cinta helicoidal) y láminas β (flechas planas). Las puntas de las flechas indican la dirección de la cadena polipeptídica. Estas combinaciones constituyen estructuras supersecundarias.

cos, a veces muy alejados entre sí en la secuencia, que promueven y mantienen los plegamientos de la cadena polipeptídica determinantes de la disposición tridimensional característica de la proteína "nativa". El proceso por el cual se obtiene la conformación correcta tiene gran importancia, es cuidadosamente regulado y facilitado por moléculas auxiliares. Proteínas defectuosamente plegadas pueden ser causa de serios trastornos y enfermedades (ver pág. 476).

La figura 3-22 muestra dos tipos de representación gráfica de cadenas polipeptídicas.

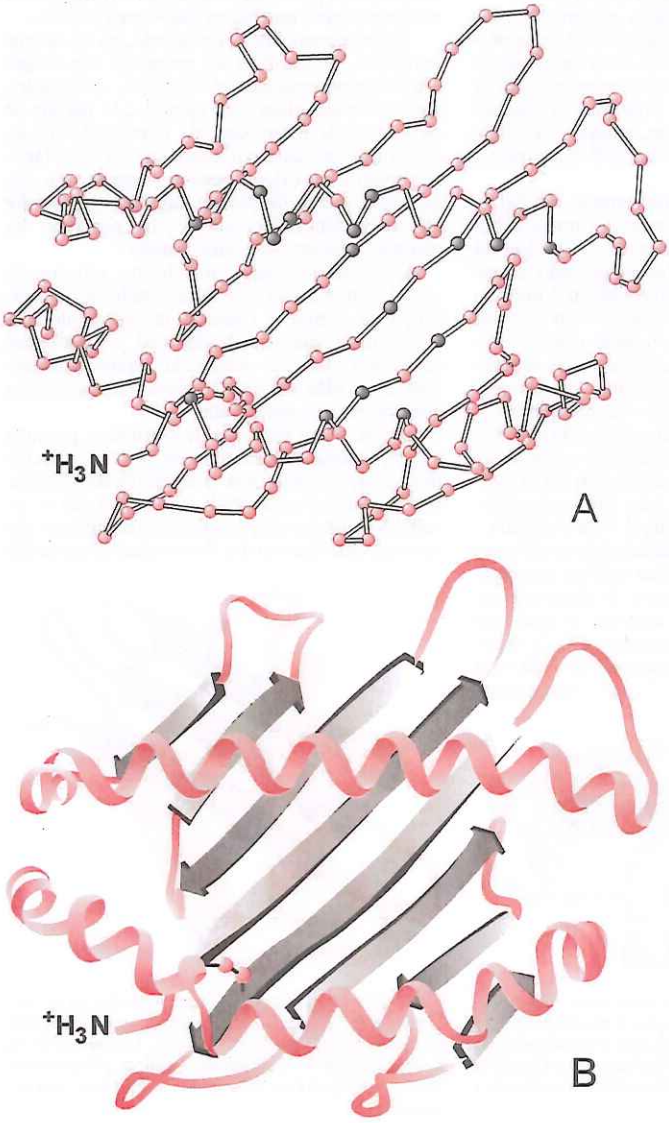


Fig. 3-22. Tipos de representación gráfica de una cadena polipeptídica. Ambos diagramas corresponden a la misma estructura. **A.** Este tipo de esquema muestra la disposición de la cadena del polipéptido representando con pequeñas esferas sólo los carbonos α de cada uno de los aminoácidos constituyentes. **B.** Se esquematizan los segmentos en hélice α como cintas helicoidales y los trozos en lámina β como flechas planas. Estas estructuras son unidas por tramos con disposición al azar. Ambas figuras representan el sitio de unión de antígeno de la proteína del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I. Las dos hélices α delimitan los flancos de un nicho cuyo fondo está formado por láminas β. En el nicho se fija el antígeno procesado. En la figura A, las esferas negras corresponden a los Cα de aminoácidos que varían entre distintas proteínas CMH. Para mayores detalles acerca de la función de esta proteína, véase página 677.

Desnaturalización de proteínas

El correcto desempeño funcional de una proteína requiere una conformación adecuada, lo cual exige mantener sus estructuras (primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria) sin modificaciones.

Cuando las proteínas son sometidas a la acción de agentes físicos como calor, radiaciones, congelamientos repetidos, grandes presiones, etc., o químicos, como ácidos o álcalis concentrados, solventes orgánicos, soluciones concentradas de urea, etc., pueden sufrir alteraciones en su conformación al afectarse las fuerzas que la mantienen. La desorganización de la estructura molecular lleva a la pérdida de propiedades y funciones naturales de la proteína. Por eso se llama a este proceso *desnaturalización*. Esta comprende ruptura de las uniones y fuerzas que mantienen las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria. La molécula se desenrolla y pierde su conformación normal (fig. 3-23).

En general, los agentes desnaturalizantes no atacan las uniones peptídicas, razón por la cual la estructura primaria de una proteína desnaturalizada no está afectada. Es común que la desnaturalización produzca insolubilización de la proteína.

Un ejemplo familiar de desnaturalización es la provocada por el calor en las proteínas de la clara de huevo. La desnaturalización se acompaña en ese caso de coagulación, que se exterioriza por la aglomeración de todas las moléculas en una masa sólida.

Frecuentemente la desnaturalización es un proceso irreversible; por ejemplo, la clara de huevo endurecida por el calor, no vuelve a su estado original. En cambio, cuando la desorganización molecular no es muy intensa, la proteína puede retomar su conformación original cuando se elimina el agente desnaturalizante; se dice entonces que el proceso es reversible.

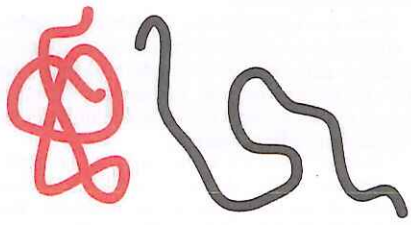


Fig. 3-23. Representación muy esquemática de una proteína al estado natural (en rojo) y de la misma proteína desnaturalizada (en negro), desplegada por ruptura de las uniones y fuerzas que estabilizan sus estructuras terciaria y secundaria. La estructura primaria no ha sido afectada.

Clasificación de proteínas

Las proteínas pueden clasificarse en dos grandes grupos: a) proteínas simples y b) proteínas conjugadas.

Proteínas simples

En esta categoría se incluían proteínas cuya hidrólisis total producía sólo aminoácidos. Sin embargo, la disponibilidad de métodos más sensibles ha permitido detectar, en la mayoría de ellas, la presencia de carbohidratos asociados a la molécula. Se las sigue clasificando en este grupo teniendo en cuenta la reducida proporción de glúcidos que contienen con respecto a la masa de proteína.

Albúminas. Son proteínas; precipitan de la dispersión por adición de sales a alta concentración, por ejemplo, sulfato de amonio a saturación.

Las albúminas tienen carácter ácido, su punto isoeléctrico está alrededor de 4,7. Constituidas por una única cadena, su masa molecular oscila entre 60 y 70 kDa. Pertenecen al tipo de proteínas globulares y se encuentran en tejidos animales y vegetales. Se les asigna nombres que indican su procedencia, por ejemplo, ovoalbúmina, lactoalbúmina, seroalbúmina, legumelina (de legumbres).

Globulinas. Son insolubles en agua pura; se disuelven en soluciones salinas diluidas. Menos hidrófilas que las albúminas, precipitan más fácilmente que ellas por adición de sales. Por ejemplo, sulfato de amonio a 50% de saturación. Si se procede cuidadosamente, las proteínas precipitadas por sulfato de amonio pueden retornar al estado nativo si se elimina el exceso de sal mediante diálisis.

La masa molecular de globulinas es variable, término medio 150 kDa. Suelen estar integradas por varias cadenas polipeptídicas. La molécula tiene forma ovoide, son proteínas globulares. En el plasma sanguíneo existe gran variedad de globulinas; se encuentran también en clara de huevo (ovoglobulina), leche (lactoglobulina), tejidos animales y vegetales.

Histonas. Fuertemente básicas, contienen alta proporción de lisina, arginina e histidina. Tienden a formar complejos con compuestos acídicos como ácidos nucleicos. Se las encuentra en los núcleos celulares, asociadas a ADN.

Protaminas. Son también proteínas de carácter básico, de molécula relativamente pequeña. Están asociadas a ácidos nucleicos en esperma de peces.

Glutelinas y gliadinas. Se encuentran principalmente en granos de cereales. Aproximadamente la mitad del total de proteínas en la harina de trigo está representada por gliadina. El maíz contiene una

proteína de este tipo, denominada *zeína*. En general, son proteínas pobres desde el punto de vista nutritivo, pues no poseen todos los aminoácidos esenciales en proporciones adecuadas (ver más adelante). Existen cuadros patológicos debidos a intolerancia a proteínas de este tipo (enfermedad celíaca).

Escleroproteínas. También llamadas albuminoides, son insolubles, presentes sólo en tejidos animales. Integran tejidos de sostén y estructuras de gran resistencia física. Pertenecen al tipo de proteínas fibrosas. Los miembros más importantes de este grupo son queratinas, colágeno y elastina.

Queratina es característica del tejido epidérmico. Predomina en la composición del pelo, uñas, lana, plumas, cuernos y pezuñas.

Colágeno es el material de fibras colágenas de tejido conjuntivo. Por cocción se transforma en gelatina.

Elastinas son proteínas de fibras elásticas de tejido conjuntivo.

Proteínas conjugadas

En estas moléculas se asocian una proteína simple y otro tipo de compuesto. Corrientemente se llama *apoproteína* a la porción proteínica, mientras el otro componente recibe el nombre de *grupo prostético*. Según las características de éste, se distinguen las proteínas conjugadas en diferentes categorías o grupos.

Nucleoproteínas. La porción proteínica está representada por una proteína simple, fuertemente básica, como las histonas, unida al grupo prostético por enlaces tipo salino.

El grupo prostético de nucleoproteínas está constituido por *ácidos nucleicos*, compuestos de gran tamaño con importantes funciones biológicas. Dedicaremos un capítulo a estas moléculas.

Cromoproteínas. Están formadas por una proteína simple asociada a un grupo prostético coloreado. En esta categoría se encuentran muchas proteínas de gran importancia, como hemoglobina; citocromos y flavoproteínas que participan en procesos de oxidorreducción; púrpura visual o rodopsina, existente en la retina y relacionada con el proceso de la visión, etc.

Glicoproteínas. Son proteínas unidas a hidratos de carbono. Estos pueden ser mono, oligo o polisacáridos, fijados a uno o muchos sitios de la cadena polipeptídica por enlaces tipo N-glicosídico (al nitrógeno del grupo amida de restos asparragina), o tipo O-glicosídico (al grupo hidroxilo de restos serina o treonina). Frecuentemente el grupo prostético lo forman heteropolisacáridos que llegan a constituir una porción considerable de la molécula.

Fosfoproteínas. Caseína de la leche y vitelina de la yema de huevo son fosfoproteínas importantes, que actúan como reservorios de fosfato. Por otra parte, la unión covalente reversible de grupos fosforilo al hidroxilo de restos serina, treonina o tirosina, constituye un mecanismo de regulación de la función de muchas proteínas.

Lipoproteínas. En ellas el grupo prostético está representado por lípidos de diverso tipo. Los complejos entre fosfolípidos y proteínas están ampliamente distribuidos en tejidos animales. En el plasma sanguíneo, las lipoproteínas cumplen la misión de transportar lípidos insolubles en el medio acuoso.

Metaloproteínas. Hay un conjunto numeroso de proteínas conjugadas con elementos metálicos como grupo prostético (Fe, Cu, Zn, Mg, Mn), esenciales para su estructura y función.

Las proteínas en la alimentación

Las proteínas tienen gran importancia como integrantes de la dieta. Los glúcidos y lípidos de los alimentos cumplen principalmente una función de aporte energético; en las proteínas, el papel energético es secundario. Ellas suministran las unidades o bloques estructurales (aminoácidos) necesarios para la síntesis de proteínas constituyentes del propio organismo. Su función principal es estructural o plástica, no reemplazable por otros principios de la dieta.

Del total de aminoácidos existentes en las proteínas, ocho (*fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptófano* y *valina*) no pueden ser sintetizados por el organismo humano. Dichos aminoácidos son designados *esenciales* o *indispensables* y deben ser necesariamente suministrados con las proteínas de los alimentos a fin de mantener el funcionamiento normal del organismo.

Otros dos aminoácidos, *arginina* e *histidina*, se sintetizan en tejidos humanos a un ritmo insuficiente para atender demandas incrementadas como las del crecimiento, embarazo o lactancia. En esos casos, arginina e histidina también deben considerarse indispensables.

Desde el punto de vista nutritivo, la calidad o "*valor biológico*" de las proteínas de la dieta depende de su contenido en aminoácidos esenciales. Proteínas de origen animal (carnes rojas y blancas, vísceras, leche, huevos) tienen, en general, mayor valor biológico que las de alimentos vegetales. Por esta razón, una dieta adecuada debe incluir proteínas de origen animal de alto valor biológico.

Estructura de proteínas y función

Los conceptos expuestos sobre estructura de proteínas pueden ser mejor interpretados con ejemplos concretos. Se presentarán algunas proteínas que ilustran la relación entre estructura molecular y función.

Colágeno

Es la proteína más abundante en vertebrados; representa más del 25% del total de proteínas del organismo. Componente estructural de gran resistencia mecánica, forma fibras del tejido conjuntivo, ampliamente distribuidas, especialmente en piel, huesos, tendones, cartílagos.

El colágeno es insoluble en agua y difícil de digerir por las enzimas del tracto gastrointestinal. Sometido a agua en ebullición se transforma en gelatina, soluble y digerible.

La estructura primaria del colágeno es muy singular. Posee una elevada proporción de restos glicina y prolina: uno de cada tres residuos en su secuencia es glicina y uno de cada cuatro es prolina. Muchos de los restos prolina están hidroxilados (4-hidroxiprolina). También se encuentran restos 5-hidroxilisina. Estos dos hidroxiderivados, raros en otras proteínas, representan juntos el 25% del total de restos aminoacídicos del colágeno. En su cadena se repite la secuencia -glicil-prolil-hidroxiprolil-, otro rasgo distintivo, pues las repeticiones o regularidades en la secuencia son infrecuentes en las proteínas en general. Triptófano y cisteína son casi inexistentes en la molécula de colágeno; los aminoácidos esenciales se encuentran en muy pequeña proporción. Esta peculiar composición aminoacídica hace de las gelatinas, derivadas del colágeno por cocción, un componente dietario de escaso valor nutritivo.

Las cadenas polipeptídicas del colágeno, debido a su estructura primaria tan rica en prolina e hidroxiprolina, no pueden formar hélices α. El núcleo pirrolidina impone a la cadena disposiciones incompatibles con la hélice α. En el colágeno se forma en cambio una hélice más extendida que la α, enrollada hacia la izquierda (hélice levógira), con tres residuos por vuelta. Este tipo de hélice es una estructura secundaria casi exclusiva de esta proteína.

Tres cadenas polipeptídicas así enrolladas se asocian para formar una *superhélice*. Las tres hélices se envuelven a su vez apretadamente sobre un eje central, de manera similar a las hebras componentes de una soga (fig. 3-24). Las cadenas se interconectan y se mantienen unidas mediante puentes hidrógeno. Estas uniones son transversales, *intercatenarias*, lo cual las distingue de la hélice α, estabilizada por enlaces *intracatenarios*.

Como la glicina es un aminoácido muy pequeño (no tiene cadena lateral), puede acomodar-

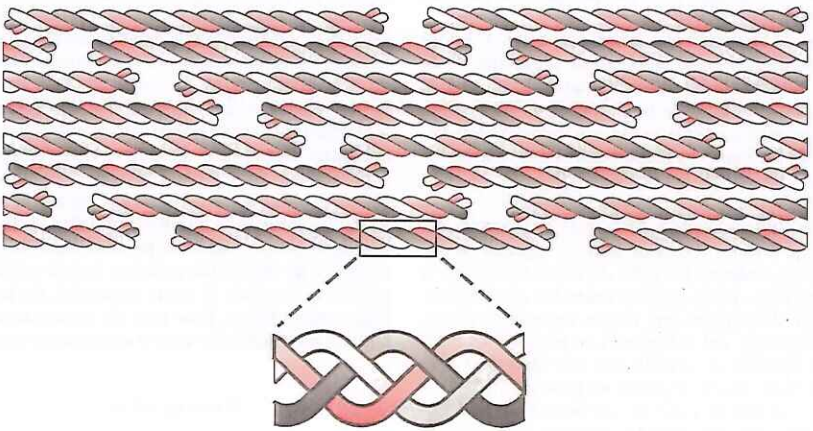


Fig. 3-24. Esquema de la estructura del colágeno. En la parte superior se muestra la disposición en haz de unidades de tropocolágeno. Se puede apreciar el escalonamiento de las unidades y los espacios que quedan entre los extremos de esas unidades en cada hilera. Todas las moléculas constitutivas tienen la misma orientación, es decir, sus extremos N-terminales miran hacia el mismo lado. En la parte inferior se esquematiza una sección ampliada de tropocolágeno, mostrando la triple hélice. Cada uno de los polipéptidos que forman la superhélice tiene una disposición extendida.

se hacia el interior de la superhélice sin estorbar la aproximación de las cadenas. Los restos más voluminosos de otros aminoácidos se proyectan hacia el exterior. No se forman puentes disulfuro porque prácticamente no existen cisteínas.

La triple hélice forma una unidad estructural llamada *tropocolágeno*, bastoncillo de 300 nm de longitud y 1,5 nm de diámetro. Cada una de las tres cadenas integrantes de esta unidad está formada por unos 1.000 aminoácidos.

Aunque todas las cadenas polipeptídicas del colágeno tienen características similares, existen distintas variedades que difieren ligeramente entre sí en estructura primaria. De acuerdo con la clase de cadenas participantes en la composición de la superhélice se han identificado diversos tipos de colágeno.

Las unidades de tropocolágeno se disponen en hileras y éstas a su vez se empaquetan en haces que constituyen fibrillas. Todas las unidades de tropocolágeno en una fibrilla tienen igual orientación, esto es, las "cabezas" (extremos N-terminales de las cadenas polipeptídicas) están dirigidas hacia el mismo lado. Las unidades que forman una hilera no entran en contacto directo, "cabeza a cola"; dejan un espacio entre sí (fig. 3-24). Se ha dado importancia funcional a estos "huecos". Los haces de fibras forman la matriz sobre la cual se produce la calcificación del hueso, y los intervalos existentes entre las unidades de cada hilera serían los sitios donde se inician los núcleos de cristalización de la porción mineral (hidroxiapatita).

Cada segmento tropocolágeno en una hilera está desplazado con respecto al segmento de la hilera adyacente en aproximadamente un cuarto de la longitud total de la unidad (fig. 3-24). Este desplazamiento se mantiene con gran regularidad en todas las filas y es responsable de las estriaciones que presentan las fibrillas colágenas cuando se las observa al microscopio electrónico.

Los tropocolágenos de hileras adyacentes establecen uniones mediante un tipo especial de enlace entre cadenas laterales de dos restos lisina o hidroxilisina. Estos enlaces cruzados entre lisinas otorgan al conjunto una mayor resistencia física. La resistencia del colágeno a la tracción es realmente enorme; se calcula que una fibra de 1 mm de diámetro puede soportar un peso de 10 kg.

El número de uniones cruzadas de lisina entre tropocolágenos vecinos aumenta con la edad, y va tornando a las fibras más rígidas y frágiles. Esto explica en parte la mayor facilidad para las fracturas óseas observada en los ancianos.

Existen al menos 14 tipos de colágenos que difieren ligeramente entre sí en la estructura primaria de sus cadenas polipeptídicas. Los llamados I, II y III son los más abundantes. El tipo I se encuentra en piel, tendones, huesos y dentina. El II, en cartílago y humor vítreo; el III, en piel, músculo y vasos sanguíneos. Los colágenos tipo IV y VII no forman largas fibrillas, sino un retículo bidimensional, principal constituyente de láminas basales. Los IX y XII, presentes en cartílago, tendones y ligamentos, están relacionados con los que forman fibrillas. Se fijan a éstas y las unen entre sí y a otros compuestos de la matriz extracelular.

Defectos genéticos pueden afectar la estructura del colágeno. Varios de estos defectos son responsables del *síndrome de Ehlers-Danlos*. Los pacientes con fallas en el gen que dirige la síntesis de colágeno tipo I tienen articulaciones muy laxas y la piel puede ser estirada fácilmente. Los casos con defectos en el gen de tipo III presentan paredes arteriales menos resistentes, lo que predispone a accidentes vasculares serios. La mayor parte de casos de *osteogénesis imperfecta*, o enfermedad de huesos frágiles, se deben a mutaciones que afectan la síntesis de colágeno de tipo I.

Queratinas

Existen dos tipos de esta clase de proteínas, las α- y las β-queratinas. Las α-queratinas son las principales proteínas del pelo y uñas y también se las encuentra en la piel de animales. Son ricas en cisteína. En la estructura de estas proteínas filamentosas predominan las α-hélices, en trozos de más de 300 aminoácidos de longitud. Dos de estas largas α-hélices suelen enrollarse una sobre otra formando una doble hélice. En el pelo, es común encontrar fibras muy flexibles, constituidas por superhélices de cuatro cadenas polipeptídicas. En otros tejidos, especialmente en las uñas, las fibras tienen menor flexibilidad debido a la existencia de gran cantidad de puentes disulfuro entre cisteínas de diferentes cadenas. Las β-queratinas presentan láminas β como elemento estructural más característico. Este tipo de proteínas se encuentra en plumas de aves y escamas de reptiles.

Hemoglobina

La hemoglobina es una proteína conjugada cuyo grupo prostético es el *hem* o *hemo*, al cual debe su intenso color rojo. Pertenece a las llamadas *hemoproteínas*, cromoproteínas de gran importancia funcional.

Entre las hemoproteínas se encuentran *citocromos*, sustancias que actúan como transportadores de electrones, *catalasa*, *peroxidasa* y otras enzimas, *mioglobina*, encargada del transporte y reserva de oxígeno en músculo, *hemoglobina*, responsable del transporte de oxígeno en sangre, etc.

Tanto mioglobina como hemoglobina están constituidas por una proteína de carácter básico (relativamente rica en lisina, arginina e histidina), llamada *globina*.

La mioglobina, cuya masa molecular es de 16.700 Da, posee una cadena polipeptídica unida a un grupo hemo, mientras la hemoglobina, de 64.500 Da, es una molécula tetramérica integrada por cadenas de globina, cada una asociada a un *hemo*. En tamaño y estructura, mioglobina semeja a una de las subunidades de hemoglobina.

Las investigaciones de Perutz y Kendrew, mediante cristalografía de rayos X, permitieron conocer la estructura de ambas moléculas y explicar el comportamiento funcional de esas sustancias.

En el estudio de la estructura de hemoglobina se considerará primero el grupo prostético hemo y luego la porción proteínica o globina.

Hemo

Es un derivado del núcleo *porfina*, gran anillo o macrociclo formado por cuatro grupos pirrol unidos entre sí por puentes metino (=CH–) (fig. 3-25). Los pirroles se numeran de I a IV y los puentes metino se designan con letras griegas, de α a δ. Los números 1 a 8 indican posiciones de átomos de hidrógeno unidos a carbonos de los grupos pirrol.

Todos los átomos componentes del anillo porfina se encuentran ubicados en el mismo plano. Esta estructura presenta resonancia; las dobles ligaduras en la figura sólo pretenden indicar que los carbonos y nitrógenos integrantes del macrociclo tienen todas sus valencias saturadas, pero podrían representarse varias formas de resonancia.

Cuando los hidrógenos de las posiciones 1 a 8 se sustituyen por restos carbonados, la porfina se convierte en *porfirina*. Las porfirinas reciben distintos nombres, según el tipo de sustituyentes. *Protoporfirina III* (IX en la notación original de Fisher), con grupos metilo ($-CH_3$) en las posiciones 1, 3, 5 y 8; vinilo ($-CH=CH_2$) en 2 y 4 y propionilo ($-CH_2-CH_2-COOH$) en 6 y 7, es la porfirina del hemo.

Una de las propiedades salientes de las porfirinas es su capacidad para formar complejos con metales. El hemo está formado por protoporfirina III con un átomo de hierro "engarzado" en el centro del anillo tetrapirrólico (fig. 3-26).

El hierro del hemo de hemoglobina es bivalente o ferroso (Fe^{2+}). Este Fe^{2+} forma seis enlaces coordinados, aceptando pares de electrones no compartidos de otros tantos ligandos.[3] Esos electrones se ubican en seis orbitales híbridos. Cuando la hemoglobina fija oxígeno, dichos orbitales tienen una configuración octaédrica. Cuatro de los enlaces coordinados unen el Fe^{2+} a los átomos de N de los pirroles, el quinto liga el hemo a un N del núcleo imidazol de un resto histidina en la globina. Una molécula de O_2 puede unirse a la sexta posición de coordinación (fig. 3-27).

Sólo cuando el hierro del hemo está al estado ferroso (ferrohemo), la hemoglobina puede formar oxihemoglobina y cumplir su función de transporte de oxígeno. Si el hierro se oxida a férrico (Fe^{3+}), el hemo se convierte en hematina, o ferrihemo, y la hemoglobina se transforma en *metahemoglobina*, incapaz de transportar oxígeno.

3 Ligando: átomo o grupo de átomos que participa en un enlace coordinado cediendo dos electrones no compartidos.

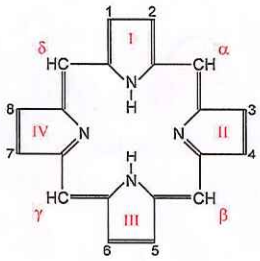


Fig. 3-25. Núcleo porfina. Los grupos pirrol se indican con números romanos; los puentes metino, con letras griegas. Números 1 a 8, posiciones que pueden ser sustituidas por diferentes cadenas carbonadas.

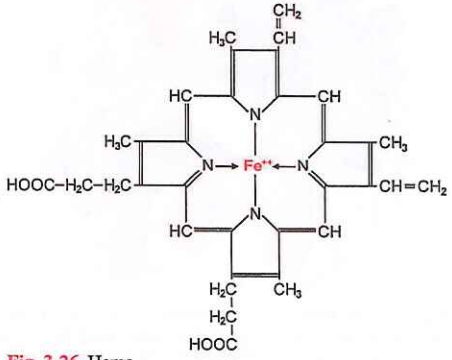


Fig. 3-26. Hemo.

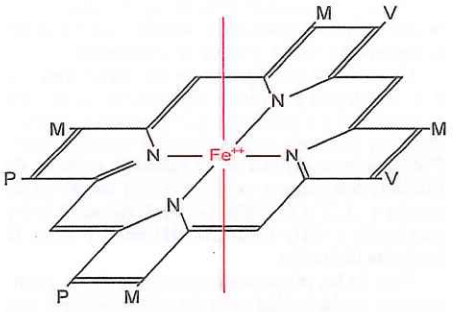


Fig. 3-27. Disposición espacial de los enlaces de Fe^{2+} en la hemoglobina, indicados en rojo. Uno se fija a histidina de la cadena correspondiente de globina, el otro enlace, a una molécula de oxígeno cuando la hemoglobina se convierte en oxihemoglobina.

Globina

La hemoglobina (Hb) es una molécula tetramérica. Está constituida por la asociación de dos cadenas polipeptídicas de 141 aminoácidos cada una (α o ζ) y otras dos cadenas de 146 aminoácidos (β, δ, γ o ε), según el tipo de hemoglobina. A pesar de las diferencias en las secuencias de estas cadenas, todas ellas poseen una conformación muy semejante.

En el hombre adulto normal se encuentran dos tipos de hemoglobina: 1) Hemoglobina A_1 (HbA_1), formada por dos subunidades α y dos β (la notación para esta molécula es $\alpha_2\,\beta_2$), es la más abundante pues representa más del 95% del total de hemoglobina en los glóbulos rojos. 2) Hemoglobina A_2 (HbA_2), constituida por dos cadenas α y dos δ ($\alpha_2\,\delta_2$), está presente en una proporción que no alcanza al 3% del total.

La sangre del recién nacido contiene otro tipo de hemoglobina, llamada fetal o F (HbF), integrada por dos cadenas α y dos γ ($\alpha_2\gamma_2$). La hemoglobina F es la predominante en el feto durante los últimos seis meses de vida intrauterina. En el momento del parto, alrededor del 80% de la hemoglobina en sangre del cordón umbilical es F (el resto es HbA_1). A partir del nacimiento se produce una reducción sostenida de HbF hasta su desaparición total, aproximadamente a la edad de 6 meses, cuando se alcanza la distribución de HbA_1 y HbA_2 propia del adulto. Durante las épocas más tempranas de la vida intrauterina (entre el primero y tercer mes) se encuentran otros tipos de hemoglobinas, llamadas *embrionarias*: Hb Gower 1, Gower 2 y Portland. La Hb Gower 1 compuesta por dos subunidades zeta (ζ) y dos épsilon (ε); la notación para esta molécula es $\zeta_2\varepsilon_2$. Las cadenas ζ son más tarde reemplazadas por las α y se forma Hb Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$). La Hb Portland es un tetrámetro $\zeta_2\gamma_2$.

Los diferentes tipos de hemoglobinas mencionados pueden distinguirse mediante electroforesis. Las diversas cadenas difieren en composición de aminoácidos y carga neta total a un pH determinado y, por ende, tienen distinta movilidad en el campo eléctrico.

Los estudios estructurales de la hemoglobina, así como los de sus propiedades funcionales, han sido realizados principalmente con HbA_1. A ella nos referiremos en las secciones siguientes.

Estructura cuaternaria de hemoglobina. Las cuatro cadenas constituyentes de la molécula se ensamblan para formar un conjunto compacto, casi esférico, de 5,5 nm de diámetro, con una

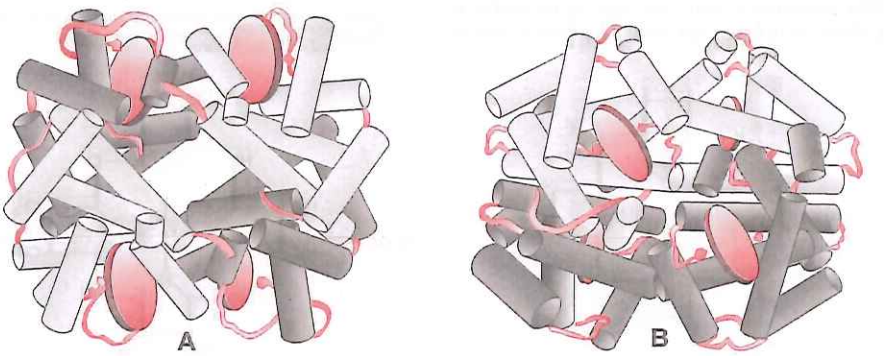


Fig. 3-28. Representación esquemática de la molécula de hemoglobina. Los segmentos de hélice α, que constituyen el 80% de la molécula, se representan como cilindros; las cadenas α en gris claro, las β, en gris oscuro, los grupos hemo, como discos rojos. A. Molécula de Hb vista desde arriba; nótese el espacio vacío en el centro. B. Vista lateral. Los hemos ocupan "nichos" o "bolsillos" que comunican al exterior.

cavidad a lo largo del eje central de la molécula (fig. 3-28). Cada una de las cadenas forma un "nicho" en el cual se aloja el hemo. Este se coloca con sus dos restos propionilo dirigidos hacia fuera. Los cuatro hemos quedan bien separados entre sí. Las uniones de las cuatro cadenas son más firmes para las subunidades diferentes (α-β) que para las de la misma clase (α-α y β-β). Entre las primeras se establecen interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno. Los contactos entre cadenas α o entre subunidades β son escasos y se limitan a atracciones electrostáticas (puentes salinos). Estas uniones no son rígidas y pueden modificarse, lo cual tiene importancia en el funcionamiento de la hemoglobina.

Estructuras secundaria y terciaria. La hemoglobina presenta características no comunes en proteínas globulares, ya que casi el 80% de la molécula posee estructura helicoidal. Cada subunidad está formada por segmentos de hélice α conectados por trozos de disposición al azar (fig. 3-29). La cadena β está formada por ocho hélices α designadas A a H a partir del extremo N-terminal. La cadena α posee siete trozos de hélice α; falta en ella el segmento D; los demás son llamados con la misma letra que los homólogos de cadena β. Los aminoácidos se numeran según su posición en la cadena o también en el segmento del cual forman parte. Por ejemplo, la histidina ubicada en el 58º lugar de la cadena α es el séptimo residuo en la hélice E; su notación es His α 58 o His α E7.

En general, los residuos polares se disponen hacia la superficie, en contacto con el medio acuoso, mientras la mayoría de los residuos hidrófobos se ubican hacia el interior, y contribuyen a estabilizar el ensamble de las cuatro subunidades y a formar el "nicho" o "bolsillo" en el cual está situado el hemo. La cavidad destinada al hemo se encuentra en el espacio entre las hélices E y F de cada cadena. El grupo prostético está unido a la globina por un enlace coordinado del átomo de Fe^{2+} con un nitrógeno del núcleo imidazol de la histidina 87 (F8) en las cadenas α y 92 (F8) en las β. El ambiente no polar alrededor del hemo es fundamental para mantener el Fe al estado ferroso y, con ello, su capacidad de transportar oxígeno.

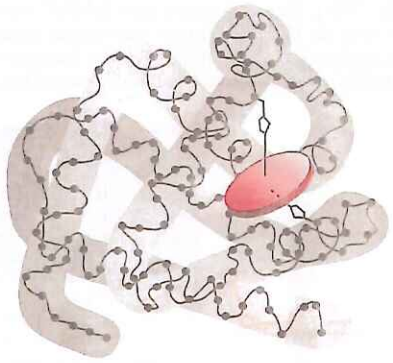


Fig. 3-29. Conformación de una cadena β de hemoglobina. Se muestran los segmentos de hélice α y los trozos de disposición al azar. El disco rojo representa el grupo prostético hemo (Perutz).

Funciones. La hemoglobina se une reversiblemente al oxígeno para formar oxihemoglobina. Una molécula de Hb reacciona con cuatro de oxígeno (una por cada hemo):

$$Hb + 4\,O_2 \rightleftharpoons \underset{\text{Oxihemoglobina}}{Hb(O_2)_4}$$

El curso de la reacción es altamente dependiente de la presión parcial de oxígeno (P_{O_2}) en el medio. Un aumento de la presión parcial de O_2 desplaza la reacción hacia la derecha (formación de oxihemoglobina), mientras una disminución de P_{O_2} la desplaza hacia la izquierda. A la presión parcial de 100 mm de Hg o Torrs o 133,322 hectopascales[4] de oxígeno existente en aire alveolar, la hemoglobina se satura casi completamente con oxígeno, es decir, cerca del 100% de la Hb se transforma en oxihemoglobina. En estas condiciones, cada gramo de Hb fija 1,34 mL de oxígeno. La sangre de un adulto normal contiene unos 15 g de Hb por dL. Por lo tanto, el total de O_2 transportado es de alrededor de 20 mL por dL de sangre (la solubilidad del O_2 en el plasma es pobre; la cantidad de este gas disuelta en él es muy pequeña comparada con la transportada por Hb y no se la tuvo en cuenta en este cálculo).

Curva de disociación del oxígeno de hemoglobina. La relación entre tensión de oxígeno y proporción de oxihemoglobina formada se describe en la curva de disociación. Una dispersión de hemoglobina se pone en equilibrio con mezclas gaseosas a presiones parciales de oxígeno conocidas y se mide el porcentaje de hemoglobina que se transforma en oxihemoglobina a diferentes P_{O2}; los resultados se representan en un

4 Torr: unidad de presión equivalente a 1 mm de Hg a 0ºC. Se la llama así en honor de Torricelli. La unidad del Sistema Internacional (SI) es el Pascal (Pa). 1 kPa = 7,5 mm Hg; 1 mm Hg = 133,322 Pa.

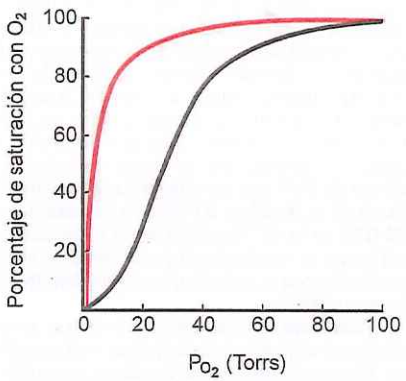


Fig. 3-30. Curva de saturación de hemoglobina (en negro) y mioglobina (en rojo). La curva de mioglobina es hiperbólica, muestra gran afinidad a bajas presiones parciales. La de hemoglobina es sigmoide; presenta menor afinidad a bajas presiones parciales, lo cual facilita la liberación de oxígeno en los tejidos.

sistema de coordenadas (fig. 3-30). En abscisas se indican los valores de P_{O_2} y en ordenadas, el porcentaje de oxihemoglobina formada. Se obtiene una curva de tipo sigmoide. A bajas presiones de oxígeno es muy pobre el ascenso, pero por encima de 10 Torrs (13,3 hPa) la curva se eleva bruscamente; a partir de esta presión, pequeños aumentos de P_{O_2} producen grandes incrementos en el porcentaje de oxihemoglobina formada. A 60 Torrs (79,8 hPa) se alcanza cerca del 90% de saturación y la curva tiende a la horizontal. Cuando se llega a 90 Torrs (119,7 hPa), prácticamente toda la Hb está saturada con O_2.

Si se realiza el mismo experimento con mioglobina, la curva tiene un aspecto muy diferente (fig. 3-30). Su forma no es sigmoide sino hiperbólica; asciende muy rápidamente a presiones reducidas de O_2.

Estas curvas muestran la mayor afinidad por el O_2 de la mioglobina comparada con la hemoglobina. A 10 Torrs (13,3 hPa), más del 85% de la mioglobina se ha oxigenado, mientras que menos de 5% de la Hb se ha convertido en oxihemoglobina. La mioglobina no sería útil como transportador de oxígeno en la sangre, pues a la P_{O_2} existente en capilares de los tejidos (alrededor de 30 Torrs, 39,9 hPa), no cedería su O_2.

La sigmoidicidad de la curva de Hb indica que, a muy bajas presiones de oxígeno, este gas se une con dificultad a la Hb, pero cuando se incrementa la presión, la formación de oxihemoglobina resulta estimulada. Aunque este fenómeno fue descripto a comienzos del siglo XX, sólo mucho después pudo ofrecerse una interpretación satisfactoria, basada en el conocimiento de la estructura de la Hb.

En su forma desoxigenada, las cuatro cadenas de la Hb se mantienen estrechamente asociadas. Las dos cadenas α y las dos β se unen entre sí mediante enlaces tipo salino, dando una conformación denominada "tensa" (T), que dificulta el acceso de O_2 a la cavidad ocupada por el hemo. En esta forma no oxigenada, el ion Fe^{2+} está unido por su quinta posición de coordinación a la histidina F8 de las cadenas de globina y se encuentra ligeramente desplazado del plano del hemo (fig. 3-31). Cuando una molécula de oxígeno accede a uno de los "bolsillos" ocupados por el hemo y se une al Fe^{2+} por su sexto enlace coordinado, se produce una tracción que lleva el átomo de Fe^{2+} al centro del anillo del hemo (fig. 3-31). Este desplazamiento del Fe^{2+} arrastra el resto de histidina al cual está unido, produce un acercamiento de las hélices E y F y finalmente un *cambio conformacional* en toda la subunidad po-

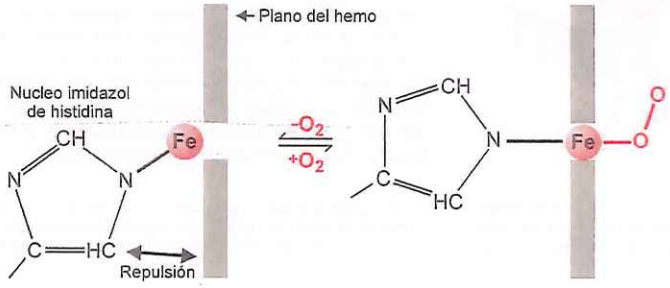


Fig. 3-31. Cambio de posición del Fe^{2+} del hemo durante la oxigenación de Hb. En la Hb desoxigenada (izquierda), el átomo de hierro está fuera del plano formado por el hemo porque el anillo imidazol de la histidina a la cual el Fe^{2+} está unido es rechazado por un N del hemo. Cuando la Hb se oxigena (derecha), el Fe^{2+} es desplazado hacia el plano del hemo y arrastra tras sí a la histidina, con las consiguientes modificaciones en la conformación de la cadena a la cual el aminoácido pertenece.

lipeptídica. Debido a las asociaciones entre las cuatro cadenas de la Hb, la modificación operada en una de ellas se transmite a las otras. Se altera la disposición relativa de las subunidades y se rompen puentes salinos intercadenas.

El cambio conformacional resultante facilita el ingreso de O_2 a los grupos hemo de otras subunidades de la molécula. Cuando está oxigenada, la Hb adquiere una conformación "relajada" (R). Este fenómeno, en el cual el ingreso de O_2 a una de las subunidades modifica su forma y transmite el cambio a las otras cadenas tornándolas más "receptivas" para el O_2, recibe el nombre de interacción hemo-hemo o *efecto cooperativo*. La interacción hemo-hemo también se cumple a la inversa: la salida de uno de los oxígenos de la oxihemoglobina tiende a restablecer la formación de puentes salinos y retorna la molécula a su forma T, con lo cual se facilita la expulsión de O_2 de las subunidades restantes.

Efectos cooperativos como el descripto han sido observados en otras moléculas proteínicas, principalmente enzimas; lógicamente, sólo ocurren en moléculas oligoméricas como la de Hb. La mioglobina, molécula monomérica, da una curva hiperbólica, no muestra efecto cooperativo (fig. 3-29).

Factores como disminución del pH, aumento de presión parcial de CO_2, presencia de compuestos orgánicos con fósforo y aumento de temperatura, producen una desviación hacia la derecha de la curva de disociación del O_2 de la Hb (fig. 3-32). Los mismos factores no modifican la curva obtenida con mioglobina. La acción de pH y CO_2 sobre la unión de O_2 y Hb se denomina *efecto Bohr*. El aumento de H^+ y de CO_2 favorece el restablecimiento de las interacciones que llevan a la conformación T de la molécula y con ello disminuye su afinidad para el oxígeno.

El efecto Bohr tiene gran significación fisiológica. A él se debe que la oxihemoglobina libere su oxígeno con más facilidad a nivel de los tejidos, donde la presión de CO_2 es elevada y el pH más bajo. Se trata de un mecanismo de regulación que promueve la liberación de oxígeno con mayor rapidez allí donde más falta hace.

2,3-bisfosfoglicerato. Una sustancia presente en glóbulos rojos en cantidades apreciables, *2,3-bisfosfoglicerato* (BPG), se introduce en la cavidad central de la molécula de Hb, establece enlaces con las dos cadenas β y contribuye a estabilizar la molécula en la forma T. Esto resulta en disminución de afinidad por el oxígeno a bajas presiones de este gas, pues existe dificultad para el acceso de O_2 a los grupos hemo (fig. 3-33).

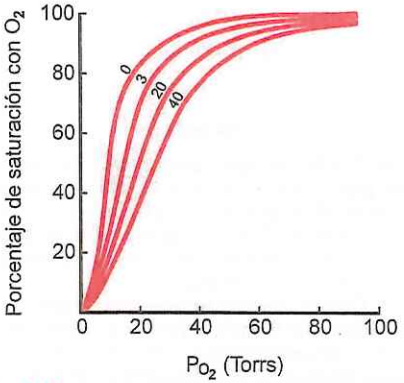


Fig. 3-32. Curvas de saturación de hemoglobina con oxígeno. Efecto de la presión parcial de CO_2. Los números sobre cada curva indican presión parcial de CO_2 (en Torrs). Al aumentar la presión parcial de CO_2 disminuye la afinidad de la Hb por O_2; el fenómeno (efecto Bohr) es notable a bajas presiones parciales de O_2; a presiones de 90 Torrs o mayores, el porcentaje de saturación es prácticamente el mismo en cualquiera de las condiciones estudiadas.

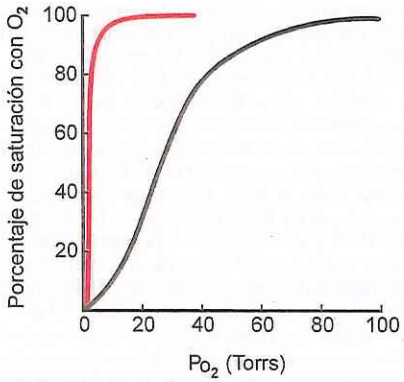
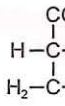


Fig. 3-33. Efecto de 2,3-bisfosfoglicerato (BPG) sobre la curva de saturación de hemoglobina. En ausencia de BPG (curva en rojo) aumenta notablemente la afinidad de Hb por O_2 a bajas presiones parciales. En presencia de BPG disminuye marcadamente la afinidad (curva en negro).

Cuando la Hb se oxigena, los puentes salinos que asocian las cadenas se debilitan, el espacio en la cavidad central se estrecha y el BPG tiende a ser desplazado (se retorna a la forma R).



2,3 - bisfosfoglicerato

El 2,3-bisfosfoglicerato cumple un importante papel fisiológico, pues su presencia en los hematíes, al disminuir la afinidad de la Hb por O_2, favorece la liberación de éste a nivel de los tejidos. Las variaciones en la concentración del BPG tienen interés clínico:

1) Uno de los mecanismos de adaptación a condiciones de hipoxia (grandes altitudes, afecciones cardiopulmonares severas) consiste en una disminución de la afinidad de la Hb por el O_2 para que éste sea más fácilmente liberado en los tejidos. Esto se logra aumentando la concentración de BPG en glóbulos rojos.

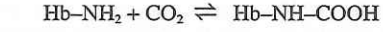
2) A la sangre utilizada en transfusiones se le agrega solución anticoagulante de citrato-glucosa. En estas condiciones, la concentración de BPG disminuye progresivamente. Esto puede ocasionar trastornos en pacientes transfundidos con volúmenes importantes de sangre conservada durante varios días. Debido al bajo tenor de BPG, la Hb de los hematíes inyectados no libera oxígeno en los tejidos con la eficiencia necesaria; el paciente puede padecer hipoxia aun cuando se haya restablecido a lo normal el volumen de sangre.

3) La hemoglobina fetal (HbF, $\alpha_2\gamma_2$) tiene mayor afinidad por oxígeno que la HbA_1. Esta es una propiedad fisiológica importante, ya que la oxigenación de la sangre del feto se realiza en la placenta por transferencia de O_2 desde la Hb materna hacia la fetal. Esto es posible gracias a la mayor avidez de la HbF por O_2. La diferencia entre HbA y HbF se debe a la menor tendencia de ésta a unirse al BPG y, en consecuencia, no experimenta disminución marcada de la afinidad por O_2 a presiones relativamente bajas del gas.

Acciones como las descriptas, en las cuales la unión de una sustancia determinada produce cambios conformacionales que afectan el funcionamiento de la molécula, reciben el nombre de *efectos alostéricos* y resultan de acciones cooperativas entre subunidades de proteínas oligoméricas.

Transporte de anhídrido carbónico

La hemoglobina participa también en el transporte de CO_2. Aproximadamente 5% del total de CO_2 vehiculizado por sangre y liberado en pulmón es transportado en forma de *carbamino* (unido a grupos amino-terminales de globina):



Cuando la sangre llega a los pulmones, la formación de oxihemoglobina favorece la liberación del CO_2 del carbamino, acción inversa al efecto Bohr.

Derivados de hemoglobina

Carboxihemoglobina

La carboxihemoglobina es el compuesto resultante de la unión de hemoglobina con monóxido de carbono (CO). Este gas se produce durante la combustión incompleta de productos orgánicos y tiene acción tóxica manifiesta pues compite con el oxígeno por el mismo sitio de unión al Fe^{2+} de la hemoglobina. Por esta razón, la hemoglobina fijada a monóxido de carbono está incapacitada para transportar O_2. La hemoglobina tiene unas 210 veces mayor afinidad por monóxido de carbono que por oxígeno. Esto explica la extraordinaria toxicidad del CO aun cuando su concentración en el aire inspirado sea relativamente pequeña. Por ejemplo, respirar durante dos horas aire con 0,02% de CO ocasiona síntomas de intoxicación, como dolor de cabeza y náuseas. Una concentración de 0,1% puede producir pérdida de conciencia en una hora y muerte por asfixia en 4 horas. Suelen ocurrir accidentes cuando la combustión del material utilizado para calefacción de viviendas es incompleta. Los gases de escape de automotores contienen entre 4 y 7% de CO y determinan fácilmente concentraciones tóxicas en ambientes poco ventilados (cocheras).

La carboxihemoglobina tiene color rojo cereza. Los sujetos intoxicados con CO muestran, por esa razón, un aparentemente "saludable" tinte rojizo en labios y mejillas.

Metahemoglobina

Metahemoglobina tiene como grupo prostético *hematina* o ferrihemo en lugar de ferrohemo. La conversión del Fe^{2+} en Fe^{3+} inhabilita a la hemoglobina para el transporte de oxígeno.

El hierro del hemo se mantiene al estado ferroso gracias a diversos factores: a) Presencia de residuos aminoacídicos no polares en los nichos de la molécula de Hb en los cuales el hemo se aloja. b) Sistemas reductores en el glóbulo rojo que impiden la elevación de los niveles de metahemoglobina.

Defectos de orden genético pueden determinar cambios en el entorno hidrofóbico del hemo

o afectar enzimas del sistema reductor y producir *metahemoglobinemia*.

Por otra parte, agentes como nitrofenoles, anilina o fármacos del tipo de las sulfonamidas, pueden producir metahemoglobinemia que, según su intensidad, da lugar a distintos grados de hipoxia tisular.

La metahemoglobina tiene color marrón oscuro. Su aumento en sangre se manifiesta clínicamente por cianosis pardusca de los tegumentos.

Hemoglobina A_{1c}

Además de las hemoglobinas A_1 y A_2, en los adultos normales se encuentra un derivado de HbA_1, denominado HbA_{1c}, producido por glicosilación; puede alcanzar hasta el 3,5% del total de hemoglobina en sangre. Se genera lentamente dentro de los glóbulos rojos por reacción entre Hb y glucosa-6-fosfato, cuyo resultado es la formación de cetoamina (amino-1-desoxifructosa) en el extremo N-terminal de las cadenas.

En pacientes diabéticos mal controlados se encuentran cantidades elevadas de HbA_{1c}. Los niveles de este derivado glicosilado pueden llegar al 15% del total de Hb y tienen relación directa con la concentración de glucosa en sangre (glucemia) durante los dos o tres meses previos a la toma de la muestra (la vida de un eritrocito es de unos 120 días; la hemoglobina obtenida de un paciente no puede tener más de esa edad). La determinación de HbA_{1c} permite saber si la glucemia ha estado elevada durante ese período inmediato anterior a la consulta.

Hemoglobinas anormales

La síntesis de las cadenas polipeptídicas (α, β, γ, δ y ε) que componen los distintos tipos de hemoglobina es controlada por genes diferentes.[5] Alteraciones en la información contenida en los genes (mutaciones) pueden generar proteínas defectuosas o incapacidad para sintetizarlas. A veces se afectan mecanismos que regulan la producción de las cadenas. Estas fallas son causa de un grupo de enfermedades hereditarias, las *hemoglobinopatías*. Actualmente suman más de 650 las anormalidades genéticas de hemoglobina observadas en humanos. Inicialmente, al descubrir una variante se la designaba con una letra mayúscula, siguiendo el orden alfabético, o utilizando la inicial del carácter más llamativo del cuadro producido por la Hb anormal. Pronto el número de variantes sobrepasó el de letras disponibles y se comenzó a utilizar el nombre del lugar donde se descubría la variante (México, Zurich, Bethesda), o el del paciente portador del defecto (Sabine, Alexandra), o del grupo étnico en el cual se la encontró (Babinga).

Se han observado distintos tipos de alteraciones: a) sustitución de uno o dos aminoácidos por otro/s. La gran mayoría de las Hb anormales descriptas pertenecen a este grupo; b) falta de uno o más aminoácidos en la cadena; c) presencia de cadenas "híbridas", formadas por trozos de dos subunidades polipeptídicas distintas (ej: la Hb Lepore o híbrido δβ); d) presencia de cadenas más largas que lo normal; e) síntesis disminuida o nula de un determinado tipo de cadena (talasemias).

Muchos de los hallazgos de hemoglobinas variantes han sido casuales, ya que no siempre una modificación en la secuencia produce alteración funcional. Sin embargo, el simple reemplazo de un solo aminoácido por otro puede ocasionar un comportamiento anómalo de la hemoglobina. Cuando el cambio altera la secuencia en posiciones críticas para la conformación y funcionamiento de la molécula, se puede producir:

1) Inestabilidad de la hemoglobina, con tendencia a precipitar dentro de los eritrocitos. Este defecto promueve la destrucción precoz de los glóbulos rojos, con un cuadro clínico de anemia hemolítica. Ej: la hemoglobina S, en la enfermedad de células en hoz (*sickle* en inglés, de allí HbS) o *anemia falciforme*. La HbS difiere de la HbA sólo en un aminoácido de la cadena β: la sexta posición, normalmente ocupada por ácido glutámico, es sustituida por valina. El reemplazo se indica por la notación $\alpha_2\beta_2^{6val}$. La alteración produce una marcada inestabilidad de la Hb, especialmente en su forma desoxigenada, que tiende a polimerizarse y precipitar. Esto deforma los hematíes (aspecto de hoz o media luna). El defecto ocurre casi exclusivamente en individuos de raza negra.

2) Modificación de aminoácidos en el entorno del hemo. Se facilita la oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+}, generando un cuadro de metahemoglobinemia. Por ej., hemoglobina M (de metahemoglobina), en la cual una de las histidinas relacionadas con el Fe^{2+} es sustituida por otro aminoácido.

3) Cambios de residuos aminoacídicos en zonas de contacto entre subunidades pueden anular los efectos cooperativos o alostéricos. La hemoglobina muestra mayor afinidad por el O_2, o no

5 En las células diploides existen dos genes para cada una de las cadenas β y δ, uno heredado de cada progenitor. Para las cadenas α y γ, debido a una duplicación, existen cuatro genes, dos procedentes de cada uno de los padres.

responde a cambios de pH o concentración de CO_2 (efecto Bohr). Esta anormalidad afecta la capacidad para liberar O_2 en los tejidos.

4) Sustitución de residuos involucrados en la unión de 2,3-bisfosfoglicerato e imposibilidad de fijar este compuesto. Como consecuencia, se produce aumento de la afinidad de la Hb por el O_2 y la liberación de este gas en los tejidos está dificultada. En todos los casos, la condición alcanza su máxima gravedad en individuos que han heredado genes defectuosos de ambos padres (homocigotas). En los que poseen un gen normal y otro alterado (heterocigotas), la seriedad del trastorno es menor.

Un grupo importante de hemoglobinopatías comprende a las *talasemias*, enfermedades genéticas en las cuales la síntesis de una determinada cadena está reducida o falta totalmente. Los síntomas comprenden anomalías morfológicas de eritrocitos, o presencia en ellos de cuerpos de inclusión (debidos a precipitación de Hb inestable), destrucción prematura de hematíes y anemia muy severa.

En las talasemias, las cadenas polipeptídicas de la Hb tienen una estructura primaria idéntica a las normales; la anomalía consiste en aparición de homotetrámeros o alteración de la proporción de los tipos de Hb habitualmente presentes en sangre. Las talasemias se observan con mayor frecuencia en países de la cuenca del Mediterráneo (Italia, Grecia), en Arabia y otros países de Asia. Junto con la HbS, son las hemoglobinopatías más frecuentes.

Cuando el trastorno afecta la síntesis de cadenas α se habla de *talasemias* α. En estos casos pueden encontrarse hemoglobinas formadas por cuatro cadenas iguales (homotetrámeros), como la HbH (β_4) y la Hb Bart (γ_4). Muy raramente se observa $Hb\delta_4$. Los homotetrámeros β_4 y γ_4 tienen mayor afinidad por el O_2 que la HbA, no presentan efecto Bohr ni responden al 2,3-bisfosfoglicerato. Por lo tanto, las HbH y Bart son funcionalmente incompetentes. La incapacidad total para fabricar cadenas α es una condición letal.

Las talasemias β producen, como efecto compensatorio de la falla en la síntesis de cadenas β, un aumento en la producción de otras subunidades. Dentro de estos cuadros es más frecuente el incremento de cadenas δ, con aumento de la proporción de HbA_2 ($\alpha_2\delta_2$) en sangre circulante. En otros casos puede persistir la síntesis de cadenas γ y, con ello, Hb fetal ($\alpha_2\gamma_2$). Mucho menos frecuente es la formación de homotetrámeros α_4. Los individuos homocigotas para este defecto padecen la llamada *talasemia beta mayor*, caracterizada por un cuadro de anemia muy grave que aparece poco después del nacimiento. Los heterocigotas o portadores pueden sintetizar cadenas β, aunque en menor cuantía que lo normal. Es la *talasemia beta menor*, que generalmente no requiere tratamiento.

Este tipo de problemas pertenece a un gran capítulo de la medicina para el cual Pauling propuso el nombre de "patología molecular" cuando describió por primera vez el defecto de la HbS. Los avances en el conocimiento de la estructura y control de los genes de la Hb, unidos al desarrollo de técnicas de "ingeniería molecular" e "ingeniería genética", abren esperanzas de solución para estas enfermedades.

Proteínas del plasma sanguíneo

El plasma sanguíneo es el medio líquido en el cual están suspendidos los elementos formes de la sangre (glóbulos rojos, leucocitos y plaquetas). La concentración total de proteínas en el plasma humano normal varía de 6 a 8 g por dL (término medio 7,2 g por dL); las proteínas constituyen la mayor parte de los sólidos del plasma.

Los primeros métodos de fraccionamiento de proteínas por precipitación con sales permitieron separar dos grupos principales de proteínas: *albúmina* y *globulinas*.

Entre las globulinas se aisló una fracción de menor solubilidad llamada *fibrinógeno*, que participa en el proceso de coagulación de la sangre.

Para obtener plasma completo debe agregarse a la sangre un agente anticoagulante, pues si se la deja coagular, el fibrinógeno se convierte en fibrina y ésta forma la red que aprisiona los elementos formes. Después de la retracción del coágulo, se separa un líquido amarillento, el *suero sanguíneo* (plasma desprovisto de fibrinógeno).

El sulfato de amonio a media saturación o sulfato de sodio al 27% precipitan las globulinas del suero y dejan sólo albúmina en dispersión. La determinación de proteínas totales en el suero y luego la de proteínas remanentes después de precipitar globulinas, permite conocer la concentración de albúmina y, por diferencia, la de globulinas. En clínica tiene interés conocer la relación entre concentraciones de albúmina y globulinas (Alb/Glob), cuyo valor normal es, término medio, 1,5. La disminución de esta relación es un hallazgo frecuente en clínica.

Cohn y sus colaboradores desarrollaron un método de aislamiento de proteínas del plasma basado en la precipitación fraccionada por agregado de etanol y modificaciones de pH en ambiente de baja temperatura y baja concentración salina. Se obtienen seis fracciones, dos de las

cuales corresponden a albúmina (fracción V) y a globulinas γ (fracción II) en condiciones de relativa pureza. Las restantes fracciones son mezclas complejas. Este método se utiliza para procesar grandes cantidades de plasma y preparar proteínas plasmáticas utilizadas con fines terapéuticos.

Electroforesis de proteínas del suero sanguíneo. A un determinado pH, los diferentes componentes proteínicos de una mezcla compleja como el plasma pueden manifestar cargas eléctricas de distinto signo y magnitud. Por esta razón migran con distinta velocidad hacia uno u otro electrodo cuando se establece un campo eléctrico en el medio. En esto se basa la electroforesis, método de separación ampliamente utilizado en el estudio de proteínas de muestras biológicas.

Los métodos más difundidos utilizan papel de filtro, acetato de celulosa o gel de agar como medio soporte sobre el cual se realiza la migración. En razón de su simplicidad, el método sobre acetato de celulosa es el más utilizado en la práctica corriente del laboratorio clínico.

En general, en esos medios se separan cinco fracciones proteínicas en el suero sanguíneo. Estas fracciones se denotan como bandas cuando se tiñe, mediante un colorante específico para proteínas, el material sobre el cual se ha realizado la migración. La intensidad de la coloración y la amplitud de cada banda son proporcionales a la cantidad de proteínas contenida en cada fracción (fig. 3-34 A). Por densitometría, un procedimiento que registra la intensidad de la tinción en los distintos sectores del material soporte coloreado, se obtiene un trazado que dibuja una serie de ondas en correspondencia con cada una de las bandas (fig. 3-34 B). La superficie de cada onda es proporcional a la intensidad de color y tamaño de las bandas originales. La medición de esas superficies permite determinar la proporción o distribución relativa de proteínas en cada fracción. Este tipo de trazado suele designarse *proteinograma electroforético*.

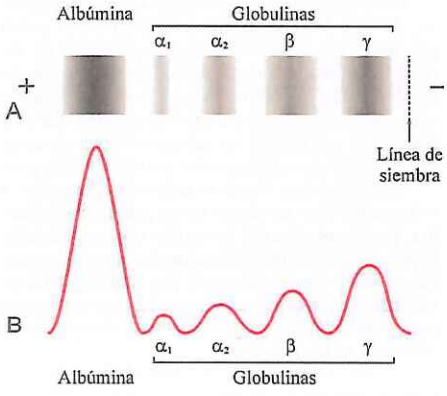


Fig. 3-34. Fracciones de proteínas del suero sanguíneo separadas mediante electroforesis sobre una cinta de acetato de celulosa. **A.** Cinta coloreada con un reactivo específico para proteínas. **B.** Trazado densitométrico de A.

Habitualmente la separación se realiza a pH 8,6. En estas condiciones, todas las proteínas séricas poseen carga electronegativa y, por lo tanto, migran hacia el ánodo. La fracción más rápida es la albúmina y detrás de ella marchan las globulinas, separadas en cuatro fracciones, α_1, α_2, β y γ, en orden decreciente de movilidad. La tabla 3-2 presenta valores normales.

Tabla 3-2. Fracciones proteicas del suero separadas por electroforesis en acetato de celulosa.
(los valores indican porcentaje del total de proteínas).

Fracción	*Rango*	*Promedio*
Albúmina	47 a 70 %	59,0 %
α_1 globulina	3 a 7 %	4,5 %
α_2 globulina	5 a 12 %	9,0 %
β globulina	5 a 16 %	12,0 %
γ globulina	10 a 20 %	15,5 %

En las técnicas de electroforesis hasta aquí mencionadas, el único factor determinante de la separación de las proteínas es su carga eléctrica. La obtención de cinco fracciones no debe tomarse como índice de la existencia de sólo cinco proteínas diferentes en el suero. Cada una de esas fracciones, sobre todo las de globulinas, es en realidad una mezcla de distintas proteínas que migran juntas porque poseen la misma carga neta.

La introducción de otros medios para la separación electroforética, como geles de almidón y poliacrilamida, mejoró notablemente la capacidad resolutiva del método, ya que en ellos la velocidad de migración no sólo depende de la carga eléctrica, sino también del tamaño y forma de la molécula. Con estas técnicas pueden diferenciarse alrededor de veinte fracciones.

Inmunoelectroforesis. Otro método que muestra la gran complejidad de las proteínas del plasma combina la electroforesis con técnicas inmunoquímicas.

Si se inyecta a un animal (conejo, caballo) suero sanguíneo humano, se le introducen proteínas extrañas. Como reacción el animal produce anti-

cuerpos específicos para cada una de las proteínas del suero humano. Al cabo de cierto tiempo, en la sangre del animal circulan anticuerpos capaces de reconocer selectivamente las proteínas del suero humano, de unirse a ellas y precipitarlas. El animal ha sido "inmunizado" contra las proteínas del suero humano. Si se le extrae sangre y se separa el suero, se obtiene un "antisuero humano".

En la inmunoelectroforesis se separan las proteínas séricas en gel de agar. Una vez completada la migración, se excava en el gel un surco o canal paralelo a la dirección de la migración. Dicho canal se llena entonces con antisuero humano. Los anticuerpos contenidos en éste difunden lentamente a través del gel de agar y cuando se encuentran con las proteínas separadas reaccionan específicamente y precipitan en el seno del gel. Este precipitado se visualiza como un arco, más ostensible si se tiñe la preparación con un colorante para proteínas. Se producen tantos arcos o líneas de precipitación como proteínas inmunológicamente diferentes existen en el suero humano. Esto permite identificar numerosos componentes proteicos del suero.

Principales proteínas del plasma sanguíneo

Se analizarán algunas características de las proteínas más importantes del plasma sanguíneo.

Albúmina. Es la más abundante (aproximadamente entre 3,5 y 4,0 g por dL). Es una proteína globular, de masa de unos 69 kDa, constituida por una cadena polipeptídica de 585 aminoácidos. Su punto isoeléctrico de 4,7 explica su manifiesta carga electronegativa a pH 8,6. La presencia de numerosos grupos reactivos en su molécula le confiere capacidad para unirse a gran variedad de sustancias; la albúmina funciona como un activo transportador de distintos compuestos (ácidos grasos, pigmentos biliares, hormonas esteroides, fármacos). Debido a su masa relativamente pequeña y a su alta concentración es responsable de una proporción muy importante de la presión oncótica del plasma (entre 75 y 80% de la presión coloidosmótica total se debe a la albúmina).

La concentración de albúmina en plasma disminuye en muchos procesos patológicos en los cuales se reduce su síntesis (desnutrición proteica, insuficiencia hepática) o en alteraciones renales que permiten su excreción por orina (nefrosis).

Globulinas. La fracción globulinas es sumamente compleja; en general, contiene proteínas conjugadas de dos tipos principales: glicoproteínas y lipoproteínas. Sólo se mencionarán algunos de los componentes de mayor interés.

Glicoproteínas. Muchas de las globulinas son proteínas conjugadas con carbohidratos.

Globulinas α_1: A ellas pertenecen, entre otras, las siguientes glicoproteínas:

α_1-antiproteinasa. También llamada α_1-antitripsina, es la más abundante de esta fracción; tiene una masa de 50 kDa y contiene alrededor de 12% de hidratos de carbono. Es uno de los principales inhibidores de serina proteasa en plasma. Protege los tejidos, especialmente el pulmonar, de la acción de proteasas liberadas por granulocitos polimorfonucleares. Algunos casos de enfisema pulmonar se deben a deficiencia de esta proteína. El hábito de fumar favorece la oxidación de un resto metionina de la α_1-antiproteinasa y la inactiva. En fumadores con bajos niveles de esta glicoproteína hay gran destrucción proteolítica de tejido pulmonar, lo que favorece la producción de enfisema.

Orosomucoide. También llamado *glicoproteína ácida* α_1, tiene elevada proporción de carbohidratos en su molécula. Es una de las proteínas cuya concentración aumenta en procesos inflamatorios, juntamente con la *proteína C-reactiva* (así llamada porque reacciona con el polisacárido C de neumococos).

Protrombina. Es el precursor de trombina, enzima que cataliza la conversión de fibrinógeno en fibrina, etapa final de la coagulación de la sangre (pág. 698).

Transcortina. Proteína encargada del transporte de cortisol, hormona de corteza suprarrenal.

Globulinas α_2: Entre ellas se encuentran:

Ceruloplasmina. Proteína de color azul intenso, de 151 kDa, contiene seis átomos de cobre por molécula. Tiene actividad enzimática de ferroxidasa. Existe una afección hereditaria, la enfermedad de Wilson, en la cual la ceruloplasmina está notoriamente disminuida en plasma. En esta condición patológica se acumula cobre en cerebro e hígado, lo cual provoca graves alteraciones.

Haptoglobina. Tiene la propiedad de unirse a la hemoglobina eventualmente presente en plasma. La formación del complejo macromolecular haptoglobina-hemoglobina impide que la pequeña cantidad de Hb liberada por hemólisis intravascular en condiciones normales sea excretada por orina (la hemoglobina libre en plasma puede atravesar el filtro renal).

α_2-macroglobulina. Homotetrámero de 720 kDa, inhibidor de proteasas. Transporta 10% del total de zinc en plasma.

Eritropoyetina. Hormona que controla la producción de glóbulos rojos (pág. 559).

***Globulinas* β:** *Transferrina* o *siderofilina.* Cada molécula fija dos átomos de hierro y sirve de

transportadora del metal en plasma. En estados de deficiencia de hierro, o durante el embarazo normal, hay aumento significativo de transferrina. En la anemia perniciosa, infecciones crónicas e insuficiencia hepática está disminuida.

β_2-*microglobulina*. Pequeña proteína de 11,7 kDa, se encuentra en membranas celulares. Forma parte de la proteína del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (pág. 681).

Si se practica electroforesis de plasma en lugar de suero, entre las globulinas β y γ se advierte la presencia de otra fracción, el *fibrinógeno*, glicoproteína que participa en la fase final de la coagulación. El fibrinógeno constituye del 4 al 6% del total de proteína del plasma (unos 0,35 g por dL). Su masa es de 340 kDa; su molécula tiene franco predominio del eje longitudinal. Otros datos estructurales se considerarán más adelante, al tratar el proceso de coagulación. Es sintetizado en hígado, razón por la cual en la insuficiencia hepática severa se produce disminución de fibrinógeno en plasma. También se han descripto cuadros hereditarios de fibrinogenopenia o afibrinogenemia (reducción o ausencia de fibrinógeno, respectivamente).

Globulinas γ o inmunoglobulinas. El ingreso al organismo de sustancias extrañas, como algunos componentes de agentes patógenos del tipo de bacterias, virus y hongos, o macromoléculas diferentes de las del propio individuo (proteínas heterólogas), determina una respuesta específica, denominada *reacción inmunitaria* (véase cap. 29). A consecuencia de esa reacción, en el organismo atacado se forman *anticuerpos*, capaces de unirse específicamente a la sustancia extraña o *antígeno*. Como resultado de esa unión puede producirse precipitación o destrucción (lisis) del agente invasor.

La mayoría de las personas que han padecido enfermedades por virus o bacterias poseen anticuerpos específicos contra los agentes determinantes de esas enfermedades; ellos las protegen de ulteriores reinfecciones. Lo mismo sucede en personas vacunadas; se dice que el individuo está *inmunizado*.

Los anticuerpos son glicoproteínas pertenecientes a la fracción de globulinas γ del plasma sanguíneo; son también denominados *inmunoglobulinas* (Ig).

Estudios mediante ultracentrifugación, electroforesis, técnicas inmunoquímicas y otras han permitido reconocer la existencia de varios tipos de inmunoglobulinas, designadas con las letras G, A, M, D y E.

Inmunoglobulinas G (IgG). Comprenden alrededor del 75% de las inmunoglobulinas circulantes en el plasma sanguíneo. Su masa molecular es de 150 kDa; su índice de sedimentación es 7S, razón por la cual las IgG también se denominan γ globulinas 7S (la unidad S de Svedberg está relacionada con la velocidad de sedimentación en la ultracentrífuga). El contenido de carbohidratos de esta glicoproteína representa el 3% del peso total de la molécula. Existen cuatro subclases, designadas IgG_1, IgG_2, IgG_3 e IgG_4.

Inmunoglobulinas A (IgA). Representan del 12 al 15% de las inmunoglobulinas del plasma. La masa molecular varía de 150 kDa a 380 kDa, su índice de sedimentación es de 7 a 11S, el contenido de hidratos de carbono es de alrededor del 12% del peso total. Se han descrito dos subclases, IgA_1 e IgA_2.

Inmunoglobulinas M (IgM). Alcanzan al 8% del total de globulinas γ. Son las Ig de mayor tamaño, con una masa próxima a 1.000 kDa e índice de sedimentación de 19S o más. Se las designa también macroglobulinas. Alrededor del 12% de su peso está representado por carbohidratos.

Inmunoglobulinas D (IgD). Representan alrededor del 1% del total de Ig; su masa es de unos 180 kDa. Los hidratos de carbono representan el 13% del peso de la molécula.

Inmunoglobulinas E (IgE). Son las de menor concentración de todas las Ig del plasma (menos del 0,3% del total); su masa es de aproximadamente 180 kDa.

La estructura, control genético y función de las inmunoglobulinas se consideran en el capítulo 29.

Los anticuerpos circulantes de un individuo inmune a determinada enfermedad infecciosa pueden ser transferidos a otro por inyección parenteral. Esta transmisión "pasiva" de inmunoglobulinas otorga al receptor protección temporaria contra la infección y es el fundamento del uso de gammaglobulina como agente profiláctico ante el riesgo de contagios.

Existen sujetos que, por un defecto genético, son incapaces de sintetizar inmunoglobulinas o tienen capacidad reducida para producirlas. Esto determina cuadros de agamaglobulinemia o hipogamaglobulinemia, de pronóstico serio, ya que los pacientes tienen disminuidas sus defensas naturales contra posibles infecciones.

En los *mielomas*, procesos de carácter tumoral maligno, se produce aumento marcado de inmunoglobulinas. Todas las Ig secretadas por un mieloma determinado tienen idéntica especificidad.

Lipoproteínas. Los lípidos son sustancias hidrófobas que no pueden ser vehiculizadas al estado libre en plasma. Por esta razón, el transporte de lípidos en sangre se realiza asociándolos a proteínas para formar complejos que pueden mantenerse en dispersión coloidal. Las lipopro-

teínas son proteínas globulares en las cuales los componentes lipídicos apolares (triacilgliceroles y ésteres de colesterol) se disponen en el interior del complejo, rodeados por fosfolípidos, colesterol libre y proteínas, con las porciones hidrofóbicas de sus moléculas dispuestas hacia el núcleo apolar, y las funciones polares al exterior, lo cual otorga hidrofilia al conjunto y asegura su estabilidad en el medio acuoso.

Se reconocen varias categorías de lipoproteínas plasmáticas, diferentes entre sí en contenido de lípidos y proteínas, en densidad, en movilidad electroforética y otras propiedades (pág. 292).

Como los lípidos tienen baja densidad, el peso específico de las lipoproteínas es tanto menor cuanto mayor es su contenido o proporción de lípidos. Esta propiedad es aprovechada para separar las distintas lipoproteínas plasmáticas mediante ultracentrifugación. Colocadas en una solución de NaCl de densidad 1,063, algunas de las lipoproteínas tienden a flotar o disponerse en las capas superiores del medio cuando éste es sometido a la fuerza centrífuga. La tendencia a flotar en un medio de densidad conocida se expresa en unidades Svedberg de flotación (S_f). A mayor valor S_f corresponde menor densidad o, en otros términos, mayor proporción de lípidos en la molécula (tabla 3-3).

De acuerdo con su densidad es posible reconocer cuatro grupos de lipoproteínas plasmáticas:

a) *Quilomicrones*, de densidad menor de 0,96.

b) *Lipoproteínas de muy baja densidad* (en inglés VLDL, de *very low-density lipoprotein*), de peso específico entre 0,96 y 1,006.

c) *Lipoproteínas de baja densidad* (LDL), entre 1,019 y 1,063.

d) *Lipoproteínas de alta densidad* (HDL, de *high density lipoprotein*), de 1,063 a 1,210.

Esta clasificación, propuesta por Fredrickson y colaboradores, ha sido adoptada internacionalmente.

Las lipoproteínas también pueden separarse mediante electroforesis. Hay buena correlación entre las fracciones obtenidas por electroforesis y las que se distinguen en base a su densidad. Así, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) migran con la velocidad de globulinas α y se las designa lipoproteínas α. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) tienen movilidad de globulinas β; se las denomina lipoproteínas β. Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) se desplazan delante de las β; se las designa lipoproteínas pre-β. Los quilomicrones prácticamente no migran en el campo eléctrico y se los encuentra alrededor del sitio de origen en los trazados electroforéticos.

La composición de las distintas categorías de lipoproteínas difiere notablemente. Las de mayor peso específico tienen mayor contenido relativo de proteína (tabla 3-3). Por ejemplo, las de muy baja densidad (VLDL) poseen 7% de proteína, mientras las de alta densidad (HDL) contienen entre 33 y 57%. Los quilomicrones, partículas de alrededor de 0,5 μm de diámetro, transportan principalmente triacilgliceroles desde el intestino hacia el sistema linfático después de la absorción de alimentos ricos en grasas y poseen muy escasa proporción de proteína (alrededor del 1%). Las proteínas forman una delgada película polar en la superficie del quilomicrón.

La proporción relativa de los distintos tipos de lípidos es diferente para cada clase de lipoproteína (tabla 3-3). Las lipoproteínas pre-β o VLDL son particularmente ricas en triacilgliceroles, mientras las lipoproteínas β o LDL poseen la mayor proporción de colesterol. En los casos de hipercolesterolemia es común encontrar incre-

Tabla 3-3. Lipoproteínas del plasma sanguíneo humano.

Fracción	Densidad	Sf	Movilidad electroforesis	Composición				
				%	%	% Lípidos totales		
				Proteínas	Lípidos totales	Triacil-gliceroles	Fosfo-lípidos	Colesterol
Quilomicrones	< 0,96	> 400	Origen	1	99	88	8	4
Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)	0,96-1,006	20-400	Pre-beta	7	93	56	20	23
Lipoproteínas de baja densidad (LDL)	1,019-1,063	2-20	Beta	11-21	79-89	13-29	27	43-58
Lipoproteínas de alta densidad (HDL)	1,063-1,210	0-2	Alfa	33-57	43-67	13-16	45	35-41

mento de LDL, principal responsable del transporte de colesterol.

La porción proteica o apoproteína de las lipoproteínas es, en general, heterogénea. Existen varias clases de apolipoproteínas, designadas con las letras A, B, C, D, E. Más comúnmente se las llama apo A, apo B, etcétera (pág. 293). En estas categorías se han reconocido varios subtipos. Para la apo A se describen tres especies diferentes: A-I, A-II y A-IV. La apo A-I es el principal componente proteínico de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Se la encuentra como constituyente menor en quilomicrones y VLDL. Es activadora de la lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT) del plasma (véase pág. 293). La apo A-II representa aproximadamente el 20% de las proteínas de HDL. La apo A-IV es sintetizada en mucosa intestinal y está asociada a quilomicrones.

Las apo B son las de mayor tamaño. Se reconocen dos subtipos, apo B-100 y apo B-48. La apo B-100 es la de masa más grande; está constituida por una cadena polipeptídica de más de 4.500 aminoácidos; es sintetizada en hígado. Representa la porción proteica más abundante en LDL y VLDL. A ella se debe el reconocimiento de las LDL por parte de los receptores celulares. La apo B-48, formada por 2.152 aminoácidos, que coinciden con los de la mitad N-terminal de la apo B-100, forma parte de quilomicrones; se sintetiza en intestino.

Las apo C son las de menor masa. Se distinguen tres variedades, C-I a C-III. La apo C-II es el activador específico de la lipoproteína lipasa que hidroliza triacilgliceroles de quilomicrones y VLDL.

La apo D se encuentra en las HDL; favorece el intercambio de ésteres de colesterol y triacilgliceroles entre VLDL y HDL.

La apo E es un componente menor de quilomicrones, VLDL y HDL. Es una glicoproteína con cuatro subtipos: E-I a E-IV. Tiene un papel importante en el metabolismo, especialmente catabolismo del colesterol. Se relaciona con el reconocimiento y captación de lipoproteínas por receptores.

Las β lipoproteínas figuran entre las proteínas plasmáticas de mayor tamaño; su masa molecular es de alrededor de 1.300 kDa. Las α lipoproteínas (HDL) son mucho más pequeñas, con una masa de 200 kDa.

Síntesis de proteínas plasmáticas. El hígado es el órgano exclusivo de producción de albúmina, fibrinógeno, protrombina y de la mayor parte de las globulinas α y β. En un hombre adulto el hígado puede sintetizar unos 20 g de proteínas plasmáticas por día. Las globulinas γ se forman en las células plasmáticas derivadas de linfocitos B (pág. 662).

El proceso de síntesis es muy activo; las proteínas del plasma se degradan y reemplazan con gran rapidez. Su vida media promedio, es decir, el tiempo durante el cual se renueva la mitad de las proteínas, es de unos 10 días.

Como el hígado es la fuente más importante de las proteínas del plasma, todo trastorno serio de la función hepática se manifiesta por alteraciones de la composición proteica del plasma. El proteinograma electroforético es un excelente auxiliar para revelar las modificaciones en la distribución relativa de las diferentes fracciones. Dichas alteraciones se conocen con el nombre de *disproteinemias*.

La disminución de la fracción albúmina (hipoalbuminemia) es un elemento constante en la insuficiencia hepática.

La síntesis de proteínas plasmáticas, como la de cualquier otra proteína, requiere el aporte de los aminoácidos necesarios. Normalmente ellos son provistos por las proteínas de la dieta. Se ha demostrado una relación directa entre cantidad y calidad de las proteínas ingeridas y producción de proteínas del plasma, incluso la de globulinas γ o anticuerpos. En la desnutrición proteica hay disminución de proteínas plasmáticas, especialmente albúmina, y déficit en la producción de anticuerpos. Esto explica la menor capacidad de defensa de los desnutridos frente a las infecciones.

Funciones generales de las proteínas del plasma. *Mantenimiento de la volemia* (ver pág. 619).

Función amortiguadora. Las proteínas plasmáticas ejercen una acción *buffer*. Al pH normal de la sangre, la capacidad amortiguadora de las proteínas depende de la presencia de restos histidina en su molécula, ya que uno de los nitrógenos del grupo imidazol puede aceptar protones (pK_a 6,0).

Proteínas del músculo

Estructura del músculo. El músculo esquelético, que en el adulto normal representa aproximadamente 40% de la masa corporal total, está constituido por células multinucleadas, rodeadas por el *sarcolema*, membrana excitable eléctricamente. Dentro de la célula se encuentran fibras formadas por haces de miofibrillas bañadas por el *sarcoplasma*. Las fibras están rodeadas por un complejo sistema de canalículos, denominado *retículo sarcoplásmico*, equivalente al retículo endoplásmico de otras células. Del sarcolema se desprenden, a intervalos más o menos regulares, tubuladuras transversales que rodean a las fibras y entran en contacto con el retículo sarcoplásmico; estos tubos constituyen el *sistema T*.

Al microscopio, las fibras musculares muestran bandas transversales regulares, alternativamente oscuras y claras, que dan el aspecto estriado del músculo voluntario. Las bandas oscuras se designan A (anisotrópicas, birrefringentes) y las bandas claras, I (isotrópicas). La región central de A, llamada zona H, aparece algo menos densa que el resto de la banda, excepto en su punto medio, donde se distingue la línea M. La banda I presenta, en su parte media, una línea muy densa y fina, perpendicular al eje longitudinal de la miofibrilla, designada línea Z (fig. 3-35). El segmento de la miofibrilla comprendido entre dos líneas Z corresponde a una unidad funcional o *sarcómero*.

La estriación regular es producida por la disposición que adoptan dos tipos de filamentos constituyentes de las miofibrillas. Existen bastoncillos o filamentos gruesos, de 1,6 μm de longitud y 16 nm de diámetro, que se extienden a lo largo de la banda A, y otros más finos, de 6 nm de diámetro, desde la línea Z hasta el límite de la zona H. En cortes transversales es posible comprobar que en la banda I sólo existen filamentos delgados; en la zona H, sólo filamentos gruesos y en las regiones más densas de la banda A, ambas clases de fibras, ordenadas de manera tal que cada filamento grueso está rodeado por seis finos, en una disposición hexagonal, mientras cada fibra delgada tiene a su alrededor tres gruesas, dispuestas simétricamente (fig. 3-35).

Desde los bastoncillos se proyectan, a intervalos regulares, prolongaciones que durante la contracción se unen con los filamentos finos, a la manera de puentes transversales (fig. 3-36).

Cuando el músculo se contrae, las bandas I y las zonas H disminuyen de longitud, lo cual reduce la distancia entre líneas Z, es decir, la extensión del sarcómero se acorta. La longitud de la banda A, que corresponde al largo de los filamentos gruesos, no se modifica. La distancia entre la línea Z y el límite de la zona H no varía, lo cual indica que los filamentos finos tampoco cambian de longitud. La contracción ha sido explicada por un mecanismo de deslizamiento de las fibras delgadas, que penetran dentro de los espacios entre los bastoncillos; el sarcómero se acorta (fig. 3-36). Los grados máximos de contracción en músculos de vertebrados pueden reducir hasta en un 40% la longitud de la fibra.

Proteínas del músculo. Las principales proteínas aisladas de miofibrillas son: miosina, actina, tropomiosina y troponina.

Miosina. Representa un 55% de la proteína del músculo y forma los filamentos gruesos o bastoncillos. Su molécula es asimétrica, con una "cabeza" globular y una larga "cola" fibrilar. Cada molécula es un hexámero de unos 500 kDa. Posee dos subunidades mayores, de 200 kDa cada una, uno de cuyos extremos forma una estructura globular, principal componente de la cabeza de la molécula. El resto de la cadena es una larga hélice α, que se enrolla en doble hélice con la porción homóloga de la otra subunidad

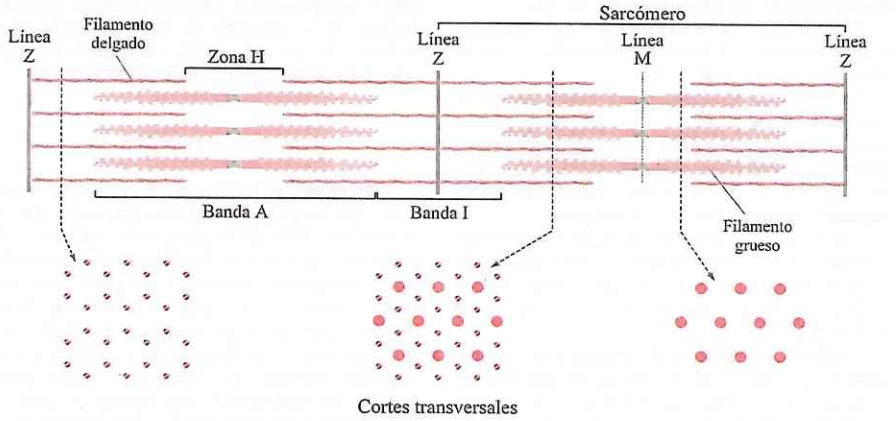


Fig. 3-35. Representación esquemática de fibrillas de músculo estriado. Arriba se muestra un corte longitudinal de músculo relajado; abajo, cortes transversales practicados a nivel de las líneas en trazo cortado. Obsérvese que la banda I contiene únicamente filamentos finos; la zona H, sólo bastoncillos gruesos y la porción más densa de la banda A, ambos tipos de filamentos.

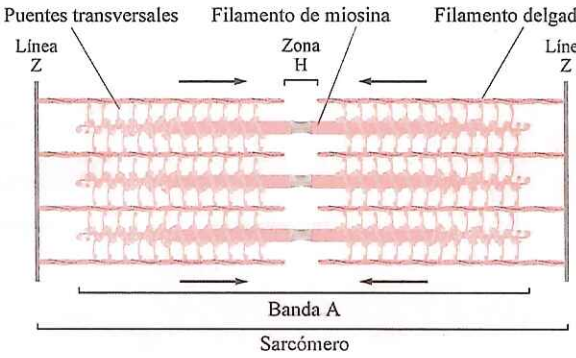


Fig. 3-36. Representación esquemática de un corte longitudinal de miofibrilla contraída. Los filamentos delgados se han deslizado, penetran entre los bastoncillos gruesos y ocupan el espacio correspondiente a la zona H en el músculo relajado. Esta zona y la banda I disminuyen notablemente su longitud.

mayor (fig. 3-37 A). Existen otras cuatro cadenas menores asociadas a la cabeza globular.

Las moléculas de miosina se unen por su porción fibrilar, para formar los haces, filamentos gruesos o bastoncillos de la banda A (fig. 3-37 B). Todas las moléculas componentes de cada mitad de estos filamentos tienen la misma orientación. Sus cabezas se disponen hacia el extremo libre y las colas se dirigen hacia la línea M en el punto medio. Es decir, existe una definida polarización de las moléculas en el bastoncillo. Las cabezas globulares se proyectan fuera del haz, como brazos o puentes transversales que pueden contactar con los filamentos delgados (figs. 3-36 y 3-39). Los dominios globulares de la miosina tienen actividad ATPasa; catalizan la hidrólisis de ATP a ADP y P_i.

Los filamentos finos de las miofibrillas están formados por tres tipos de proteínas diferentes: actina, tropomiosina y troponina.

Actina. Representa el 25% de la proteína muscular. Los monómeros de 45 kDa, llamados actina G, son globulares. Estas subunidades se polimerizan para formar actina F, proteína fibrosa constituida por dos hileras de monómeros enrolladas en hélice (fig. 3-38). No posee actividad catalítica.

Tropomiosina. Es una proteína fibrosa, de unos 64 kDa, formada por dos cadenas enrolladas entre sí en doble hélice. Sus moléculas se disponen una a continuación de otra, alojadas en los surcos que forma el filamento de actina (fig. 3-38).

Troponina. Es un complejo de tres proteínas diferentes, T, C e I, unidas no covalentemente. El complejo se fija a los filamentos delgados a intervalos regulares; un complejo de troponina por molécula de tropomiosina (fig. 3-38). La troponina T se une a la tropomiosina; la troponina I actúa como inhibidora de las interacciones de miosina y actina. La troponina C es una proteína fijadora de iones Ca^{2+}; su estructura es semejante a la de calmodulina (pág. 502).

Existen otras proteínas en las fibrillas musculares; a efectos de simplificar, sólo mencionamos las más directamente comprometidas en el proceso de contracción.

Titina. Proteína fibrilar de gran tamaño (masa 3.000 kDa). Se extiende como un resorte desde la línea M hasta el disco Z; sostiene los bastoncillos

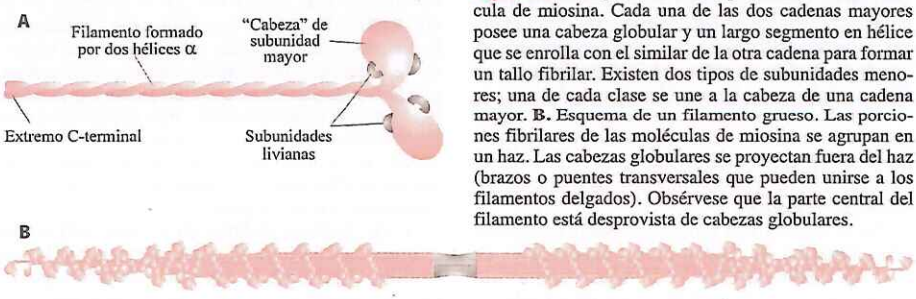


Fig. 3-37. **A.** Representación esquemática de una molécula de miosina. Cada una de las dos cadenas mayores posee una cabeza globular y un largo segmento en hélice que se enrolla con el similar de la otra cadena para formar un tallo fibrilar. Existen dos tipos de subunidades menores; una de cada clase se une a la cabeza de una cadena mayor. **B.** Esquema de un filamento grueso. Las porciones fibrilares de las moléculas de miosina se agrupan en un haz. Las cabezas globulares se proyectan fuera del haz (brazos o puentes transversales que pueden unirse a los filamentos delgados). Obsérvese que la parte central del filamento está desprovista de cabezas globulares.

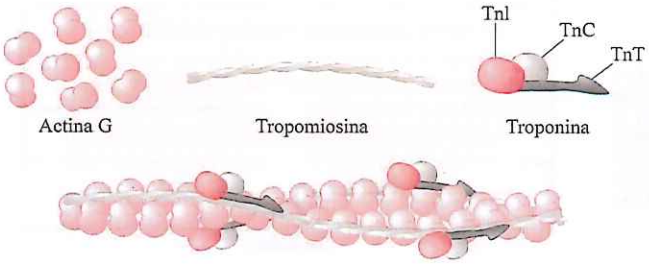


Fig. 3-38. En la parte superior de la figura se representan las proteínas constituyentes de los filamentos delgados; abajo se ilustra el ensamble de un filamento fino. Los monómeros de actina G se disponen formando una hebra o cadena de actina F, que semeja una doble hélice. Las moléculas de tropomiosina se alojan en los surcos helicoidales que forma la hebra de actina. La troponina, constituida por tres proteínas (TnT, TnI y TnC) se fija al filamento de tropomiosina a intervalos regulares.

de miosina centrados en el sarcómero y ayuda a mantener la tensión de las fibrillas musculares que les permite volver a su posición de reposo si son extendidas en exceso.

Nebulina. Forma fibrillas muy finas asociadas a la actina; se cree que determina la longitud de los filamentos de actina.

En el sarcoplasma se encuentra *mioglobina*, hemoproteína que une reversiblemente oxígeno; desempeña funciones de almacenamiento y transporte de ese gas dentro de la célula.

El *fosfolambano*, de 20 kDa, es un pentámero de subunidades idénticas, especialmente importante en miocardio. Es un inhibidor de la Ca^{2+}-ATPasa de retículo sarcoplásmico. Cuando es fosforilado por proteína quinasa A dependiente de AMP cíclico o por quinasas dependientes de calmodulina, se suprime esa acción inhibitoria, lo cual acelera el retorno de Ca^{2+} desde el citosol hacia las cisternas del RS y favorece la relajación del músculo.

Contracción muscular

El acortamiento de las miofibrillas es el resultado de un complejo juego de interacciones moleculares. De los mecanismos propuestos para explicar la contracción muscular, el más ampliamente aceptado es el que propone el deslizamiento de las fibrillas delgadas entre los filamentos gruesos.

Los dominios globulares de miosina, en los extremos de los brazos transversales de los filamentos gruesos, tienen actividad ATPasa y un sitio por el cual pueden unirse a la actina de los filamentos delgados.

En el músculo en reposo, relajado, existe alta concentración de ATP y muy bajos niveles de Ca^{2+} (alrededor de 10^{-7} M). En estas condiciones la miosina no está asociada a la actina. Cada cabeza globular fija una molécula de ATP y la hidroliza a ADP y P_i, productos que siguen unidos a la miosina. La energía liberada en la reacción queda retenida en el brazo transversal, el cual adopta una conformación "tensa". Para transformar esta energía en movimiento de la miofibrilla, las cabezas de miosina deben establecer contacto con los filamentos de actina, formando puentes entre bastoncillos gruesos y finos.

La llegada de un estímulo nervioso a la placa motora produce despolarización del sarcolema, que se transmite rápidamente al interior de la célula por las membranas del sistema T; se produce apertura de canales de Ca^{2+} en membranas del retículo sarcoplásmico y liberación del ion al citosol. La concentración de Ca^{2+} aumenta bruscamente de 10^{-7} M a 10^{-5} M, se une a troponina C, provoca en ella un cambio conformacional que se transmite a las troponinas I y T y, por intermedio de ésta, a tropomiosina. Se produce entonces un desplazamiento de la hebra de tropomiosina en el surco helicoidal del filamento de actina. En su posición de reposo, la tropomiosina bloquea los sitios de la actina en los cuales se fija la miosina e impide la formación de puentes transversales. El cambio conformacional promovido por el aumento en la concentración de Ca^{2+} deja expuestos los sitios de la actina. Algunos autores piensan que este modelo de bloqueo y desbloqueo estérico de la actina por la tropomiosina es algo simplista y proponen la existencia de interacciones más complejas entre las proteínas actuantes. De cualquier manera, el resultado es la unión de las cabezas de miosina a la actina, estableciendo una estrecha asociación entre filamentos gruesos y finos.

Cada dominio globular de miosina está unido a la porción fibrilar de la molécula por un brazo flexible, al menos con dos sitios "bisagra" que le permiten cambiar la angulación del brazo transver-

Fig. 3-39. Mecanismo de deslizamiento que determina la contracción muscular. Los puentes transversales del bastoncillo grueso de miosina se unen al filamento delgado y realizan un movimiento de remo que desplaza al filamento fino hacia el centro del sarcómero. Como las moléculas de miosina están polarizadas, los brazos transversales en cada mitad del bastoncillo tiran en direcciones opuestas.

sal. La cabeza, que se encuentra en estado "tenso" gracias a la energía cedida por la hidrólisis del ATP, tiende a volver a una posición de menor energía. Esto le otorga una fuerza de empuje que produce un movimiento de "remo" en el brazo transversal y provoca el deslizamiento del filamento delgado, introduciéndolo hacia el centro del sarcómero (fig. 3-39). Como en los filamentos gruesos las moléculas están polarizadas, la dirección de las fuerzas desarrolladas en una mitad del bastoncillo es de sentido opuesto al de la otra mitad.

La cabeza se desprende de la actina, vuelve a su posición de reposo y puede iniciar un nuevo movimiento fijándose a otro sitio del filamento delgado. Esta acción sigue repitiéndose mientras la concentración de Ca^{2+} se mantenga elevada.

El desplazamiento de los brazos transversales de la miosina es el resultado de un ciclo de reacciones (fig. 3-40):

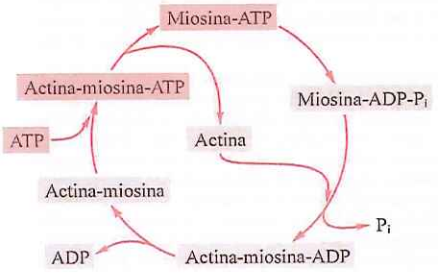


Fig. 3-40. Ciclo de reacciones en la contracción muscular.

1) El dominio globular de la miosina fija ATP y lo hidroliza a ADP y P_i. Se forma un complejo miosina-ADP-P_i, de alto contenido energético.

2) El estímulo nervioso que induce la contracción produce una súbita elevación del Ca^{2+} en el sarcoplasma y con ello un cambio en el complejo de troponina y en la posición de la tropomiosina, que permite la unión de la cabeza de miosina al filamento de actina. Se libera el P_i y el brazo lateral realiza un movimiento de remo para alcanzar una posición de menor energía. En este desplazamiento arrastra al filamento delgado y determina el acortamiento de la miofibrilla.

3) Se desprende el ADP y se une otra molécula de ATP a la miosina. Esto disminuye su afinidad por la actina y hace que la cabeza globular se desprenda de la actina F. La miosina-ATP puede iniciar otro ciclo. Cuando se agota el ATP en las células el músculo queda contraído; el complejo miosina-actina no puede disociarse. Esto explica la rigidez cadavérica (*rigor mortis*).

Los ciclos de deslizamiento de las fibras delgadas entre las de miosina continúan mientras el nivel de calcio en el sarcoplasma sea elevado. Cuando cesa el estímulo que originó la contracción, el Ca^{2+} es derivado hacia las cisternas del retículo sarcoplásmico por acción de la Ca^{2+}-ATPasa o "bomba de calcio", que transfiere dos iones Ca^{2+} por cada ATP hidrolizado. Se reduce la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma, la troponina C se disocia del Ca^{2+}; la tropomiosina vuelve a su posición de reposo, los brazos transversales de miosina no pueden seguir unidos a la actina y se produce la relajación muscular.

RESUMEN

Las proteínas son los componentes orgánicos más abundantes en el organismo de animales superiores. Tienen gran importancia, ya que desempeñan el papel protagónico en casi todos los procesos biológicos. En su constitución participan los elementos C, H, O y N; en la gran mayoría de proteínas se encuentra también S. Son macromoléculas poliméricas cuyas unidades estructurales, los *aminoácidos* (AA), poseen al menos una función

ácida (carboxilo) y otra básica (amina) unida al carbono α (α-aminoácidos). Por hidrólisis de proteínas se obtienen hasta 20 especies de AA. Los distintos AA difieren en la naturaleza de su cadena carbonada. Todos ellos, excepto glicina, presentan isomería óptica, determinada por la configuración en el carbono α. Las proteínas naturales están formadas por AA de la serie L. De acuerdo con las características de la cadena de carbonos, los AA se clasifican en: a) *Alifáticos neutros de cadena apolar* (glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina). b) *Alifáticos neutros de cadena polar no ionizable* (serina y treonina). c) *Aromáticos neutros* (fenilalanina, tirosina y triptófano). d) *Con azufre* (cisteína y metionina). e) *Dicarboxílicos* (ácido aspártico y ácido glutámico) f) *Derivados amídicos* de los dicarboxílicos (asparragina y glutamina). g) *Básicos* (lisina, arginina e histidina). h) *Iminoácido* (prolina), en el cual el Cα está incluido en un anillo pirrolidina.

La existencia de grupos ácido y básico en su molécula convierte a los AA en iones bipolares, anfólitos o anfóteros. En solución neutra, las funciones ácida y básica están ionizadas. En medio ácido fuerte, la función carboxilo capta un protón; el AA adquiere carga positiva y se comporta como catión. En medio alcalino fuerte, la función amina libera un protón; la carga del AA se torna negativa y actúa como anión. Cuando la disociación de funciones + y – en la molécula está equilibrada, la carga neta o total es nula. El pH al cual ello ocurre es el *punto isoeléctrico* (pHi o pI) del AA. El único AA que puede actuar como amortiguador al pH existente en el organismo es histidina (un N del núcleo imidazol de este AA puede captar un protón; su pKa es 6,0).

Los AA se unen entre sí mediante *enlaces peptídicos*. En esta unión participan, con pérdida de agua, el grupo carboxilo de un AA y el grupo amina del Cα de otro. La unión sucesiva de AA con este tipo de enlace forma cadenas lineales en cuya constitución pueden participar desde 2 hasta miles de AA. Una vez integrados en la cadena, los AA son considerados residuos o restos de AA. Por convención se fija como comienzo de la cadena al extremo en el cual el resto aminoacídico tiene su grupo α-amina libre; es el extremo *N-terminal*. El otro extremo posee el grupo carboxilo libre del último AA; es el final de la molécula o extremo *C-terminal*. Se denominan *péptidos* a los polímeros cuya masa molecular es menor de 6 kDa. Los péptidos poseen propiedades ácido-base similares a las de AA. Además de los grupos amina y carboxilo terminales, también pueden ionizarse los grupos de cadenas laterales de los restos AA dicarboxílicos y básicos. En la naturaleza se encuentran muchos péptidos que desempeñan importantes funciones. Los polímeros de AA cuya molécula exceda la masa de 6 kDa son considerados *proteínas*. La carga eléctrica de las proteínas depende del estado de ionización de funciones disociables en las cadenas laterales de los restos AA constituyentes. El pH de la solución en la cual se encuentra la proteína condiciona ese estado de ionización. El pH en el cual las cargas + y – se equilibran (carga eléctrica total = 0) corresponde al punto isoeléctrico (pHi o pI) de la proteína. En medio ácido con respecto al pI, la carga de la proteína es positiva, mientras que en medio alcalino, es negativa. La magnitud de la carga eléctrica es tanto mayor cuanto más alejado del pI es el pH del medio. La carga de la proteína es un factor importante en relación con su estabilidad en medios acuosos. El pH y la presencia de sales y solventes no polares influyen marcadamente en la solubilidad de proteínas.

La *electroforesis* es un método de separación de proteínas en una mezcla. Al hacer pasar una corriente eléctrica continua a través de la mezcla, las proteínas migran hacia uno u otro polo con una velocidad proporcional a su carga.

La masa molecular de las proteínas varía de 6.000 a millones de daltons. Las proteínas pueden ser separadas de otras moléculas pequeñas existentes en la mezcla mediante *diálisis*. Para ello se utilizan membranas semipermeables.

Estructura. Las proteínas se caracterizan y distinguen entre sí, no sólo por la cantidad y naturaleza de los AA componentes, sino por el orden en el cual se disponen los AA. La *estructura primaria* refiere a ese ordenamiento o secuencia de AA en una cadena polipeptídica. El tipo y secuencia de los AA que forman una proteína son los principales factores determinantes de su conformación, propiedades y funciones. La secuencia de AA está predeterminada en los genes que controlan la síntesis de cada proteína.

El enlace C–N de la unión peptídica tiene características intermedias entre un enlace simple y uno doble, razón por la cual no permite libre rotación. En consecuencia, esos dos átomos y el O e H a ellos ligados permanecen en un mismo plano. Los enlaces Cα–C y N–Cα pueden rotar libremente, de modo que los grupos unidos a los Cα adoptan distintas posiciones en el espacio. Estas disposiciones corresponden a la *estructura secundaria* y originan diferentes distribuciones espaciales de los elementos componentes de las cadenas. Las más importantes son: a) *Hélice α*: la cadena se enrolla de una manera regular alrededor de un eje central. Cada vuelta de hélice comprende casi cuatro restos AA. Esta estructura se mantiene gracias a puentes H extendidos entre el N (resto de una función amina) y el O (del resto carboxilo interesado en la unión peptídica) de residuos AA ubicados en vueltas contiguas de la hélice. b) *Lámina β*: la cadena está extendida al máximo. Dos o más cadenas así estiradas pueden aparearse y establecer enlaces de H para formar estructuras laminares en zigzag. c) *Disposición al azar*: la cadena no sigue un patrón repetitivo como los anteriores; adopta la configuración termodinámicamente más favorable.

Según la forma de su molécula, las proteínas se clasifican en *globulares* y *fibrosas*. En las proteínas fibrilares suelen presentarse exclusivamente estructuras en hélice α; en las globulares pueden encontrarse porciones en hélice α, en lámina β, o ambas, unidas entre sí por segmentos al azar. También puede disponerse al azar toda la molécula. La conformación tridimensional corresponde a la *estructura terciaria*. Esta depende de distintas fuerzas que mantienen plegamientos y acodaduras de la cadena polipeptídica: a) Fuerzas de atracción o repulsión electrostática. b) Enlaces de H entre grupos funcionales de cadenas laterales de restos AA (distintos de los que forman los puentes H que mantiene hélices α y láminas β). c) Influencia de restos hidrofóbicos o hidrofílicos. d) Puentes disulfuros entre cisteínas ubicadas en sitios distantes de la cadena. Como resultado de estas fuerzas, ciertos segmentos de una proteína presentan asociaciones de hélices α y/o láminas β dispuestas de manera más o menos estable. Estas asociaciones se comportan como unidades estructurales y funcionales dentro de la molécula y reciben el nombre de *dominios*.

En las proteínas formadas por varias subunidades (oligoméricas) se considera la *estructura cuaternaria*, es decir, la disposición espacial de las diferentes cadenas polipeptídicas o subunidades que la integran.

Agentes físicos o químicos pueden producir alteraciones en las fuerzas que mantienen las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de una proteína, la cual pierde su conformación nativa y sus propiedades originales. El proceso es denominado *desnaturalización*.

Proteínas simples son aquellas constituidas sólo por AA; en cambio, las *conjugadas* están formadas por una proteína simple (apoproteína) y una porción no proteínica (grupo prostético).

Colágeno. Es una proteína fibrilar constituyente de fibras del tejido conjuntivo. Sus moléculas tienen una particular composición (ricas en glicina, prolina y derivados hidroxilados de prolina y lisina). Forma un tipo peculiar de hélice, más extendida que la hélice α.Tres de estas moléculas se asocian en una superhélice que constituye la unidad estructural llamada *tropocolágeno*. Las unidades de tropocolágeno se disponen muy regularmente en haces cuyo conjunto forma las fibrillas del colágeno, de gran resistencia mecánica.

Hemoglobina. Es una proteína conjugada (hemoproteína) de forma globular. Su función principal es transportar O_2 desde los pulmones a los tejidos. Está formada por cuatro cadenas polipeptídicas (HbA_1, la más abundante en el adulto, es el tetrámero $\alpha_2\beta_2$). Cada una de las subunidades está unida a un anillo tetrapirrólico que posee Fe^{2+} (hemo). La unión de O_2 al Fe^{2+} del hemo de una de las subunidades de desoxiHb produce un cambio conformacional que se transmite al resto de la molécula y facilita el acceso de O_2 a los hemos de las otras subunidades (efecto cooperativo). El aumento de la $[H^+]$, de la P_{CO_2} y la presencia de compuestos fosforados como el 2,3-bisfosfoglicerato, disminuyen la afinidad de la Hb por O_2 y favorecen la liberación de O_2 de la oxiHb en los tejidos periféricos. Acciones cooperativas del tipo descripto en Hb se observan también en otras proteínas oligoméricas (proteínas alostéricas).

La importancia de la estructura en la eficiencia funcional de la Hb (y de otras proteínas) se pone de manifiesto en ciertos defectos genéticos (mutaciones) que determinan cambios en la secuencia de AA de las cadenas. En algunos casos, basta la sustitución de un AA para alterar gravemente las propiedades de la proteína.

Proteínas del plasma. 6 a 8 g por dL. Mediante electroforesis del suero sanguíneo en acetato de celulosa se separan albúmina y globulinas α_1, α_2, β y γ. *Albúmina*: la fracción más abundante (3,5-4,0 g por dL). Es una proteína globular, de 69 kDa, formada por una cadena de 610 aminoácidos; pH_i 4,7. Activo transportador de ácidos grasos, pigmentos biliares, hormonas esteroides y fármacos. *Globulinas*: muchas son glicoproteínas: globulinas α_1: α_1-antiproteinasa, orosomucoide, protrombina, transcortina; globulinas α_2: ceruloplasmina, haptoglobina, α_2-macroglobulina, eritropoyetina; globulinas β: transferrina, β_2-microglobulina; globulinas γ: a esta fracción pertenecen los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig). Cinco clases: IgG, la más abundante, 75% del total, 150 kDa; IgA (150 a 600 kDa), 12 a 15%; IgM, las de mayor tamaño, unos 1.000 kDa, 3%; IgD, masa de 180 kDa, 1% del total; IgE, las de menor concentración. *Lipoproteínas*: vehiculizan los lípidos en el plasma. Cuatro grupos: a) Quilomicrones, densidad < 0,96, no migran en la electroforesis. b) Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), densidad entre 0,96 y 1,006, migran delante de la globulina β, por eso se las llama pre-beta. c) Lipoproteínas de baja densidad (LDL), densidad entre 1,019 y 1,063, migran como globulinas β. d) Lipoproteínas de alta densidad (HDL) (1,063-1,210), migran como globulinas α. Las lipoproteínas más densas tienen proporcionalmente más proteínas. Las HDL, entre 33 y 57%; las VLDL, 7%; los quilomicrones, 1%. Los quilomicrones y VLDL son ricos en triacilgliceroles; las LDL poseen mayor proporción de colesterol. La porción proteica o apoproteína puede ser apo A, apo B, apo C, apo D y apo E; en cada clase hay subtipos. Las apo A son los principales componentes proteicos de HDL; las apo B, de LDL y VLDL. *Síntesis de proteínas plasmáticas*: la albúmina y la gran mayoría de las globulinas se sintetizan en el hígado (unos 20 g por día). Las Ig se sintetizan en células plasmáticas. *Funciones*. Mantenimiento de la volemia: la albúmina es responsable de más del 75% de la presión oncótica del plasma. *Función amortiguadora*: las proteínas del plasma ejercen acción *buffer* gracias a los restos histidina, que ceden o aceptan protones al pH normal de la sangre.

Proteínas del músculo. Las principales son miosina, actina, tropomiosina y troponina. La miosina forma los filamentos gruesos de las bandas A del sarcómero. Sus moléculas tienen cabezas globulares que sobresalen de los filamentos como brazos laterales; poseen actividad ATPasa. La actina G, polimerizada como actina F, forma los filamentos finos. A ella se asocian tropomiosina y troponina (complejo de troponinas T, C e I). *Contracción*: el acortamiento de las fibrillas se produce por el deslizamiento de los filamentos finos entre los gruesos. En reposo hay alto contenido de ATP y bajos niveles de Ca^{2+}, condiciones en las que la miosina y la actina no están asociadas. Las cabezas globulares de miosina unen ATP y lo hidrolizan a ADP y P_i, el complejo miosina-ADP-P_i tiene alto contenido energético y permanece en posición "tensa". La llegada de un estímulo nervioso determina un brusco aumento de la concentración de Ca^{2+} en el sarcoplasma. Se une Ca^{2+} a la troponina C y produce un cambio conformacional que se transmite a la tropomiosina. Esto permite la unión de los brazos transversales de la miosina a los filamentos de actina. Como las cabezas de miosina tienden a volver a una posición de menor energía, arrastran al filamento delgado y determinan el acortamiento de la fibra. Se liberan P_i y ADP. Otra molécula de ATP se une a la miosina y disminuye la afinidad miosina-actina, razón por la cual ambas se separan. La miosina-ATP repite el ciclo siempre que el nivel de Ca^{2+} se mantenga elevado.

BIBLIOGRAFÍA

Branden C., Tooze J. (1999). *Introduction to Protein Structure*, 2da. Ed., Garland Publishing Co., Nueva York.

Creighton T.E. (1993). *Proteins, structures and molecular properties*, 2da. Ed., W.H. Reeman, Nueva York.

Hsia C.C.W. (1998). Respiratory function of hemoglobin. *The New England Journal of Medicine*, 338: 239-247.

Geeves M.A., Colmes K.C. (1999). Structrural mechanisms of muscle contraction. *Annual Review of Biochemistry*. 68: 687-728.

Molloy J.E., Veigel C. (2003). Myosin motors walk the walk. *Science*. 300: 2045-2046.

Nigg B.M., Herzog W. (Eds.). (1998). *Biomechanics of the muscle-skeletal system*, 2da. Ed., John Wiley & Sons, Chichester.

Ponting C.R., Russell R.R. (2002). The natural history of protein domains. *Annual Reviews of Biochemistry*, 31: 45-71.

Prokod D.J., Kivirikko K.L. (1995). Collagens, molecular biology, diseases and potentials for therapy. *Annual Review of Biochemistry*. 64: 403-434.

CAPÍTULO 4

Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono, también llamados *carbohidratos* o *glúcidos*, son importantes componentes de los seres vivos. Abundan en tejidos vegetales, en los cuales forman los elementos fibrosos de su estructura y los compuestos de reserva nutricia de tubérculos, semillas y frutos. También se encuentran ampliamente distribuidos en tejidos animales, disueltos en los humores orgánicos, y en complejas moléculas con diversas funciones.

Los vegetales sintetizan hidratos de carbono a partir de CO_2 y H_2O captando energía lumínica en un proceso denominado *fotosíntesis*. Estos glúcidos son ingeridos por animales, y en gran parte utilizados como combustible. En la alimentación humana, los carbohidratos son los principales proveedores de energía. En una dieta equilibrada, los hidratos de carbono deben aportar entre 50 y 60% del total de calorías.

Los glúcidos están compuestos por carbono, hidrógeno y oxígeno y se definen como *polihidroxialdehídos* o *polihidroxicetonas*. Es decir, son compuestos con una función aldehído o cetona y varias funciones alcohólicas. También se consideran glúcidos las sustancias que originan esos polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas cuando son sometidas a hidrólisis.

Clasificación. Según la complejidad de la molécula, los hidratos de carbono se clasifican en monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos.

a) *Monosacáridos* o azúcares simples, formados sólo por un polihidroxialdehído o polihidroxicetona. Se obtienen como cristales de color blanco, solubles en agua. Muchos de ellos tienen sabor dulce. El representante de mayor importancia de este grupo es la glucosa.

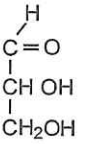
b) *Oligosacáridos*. Compuestos por la unión de dos a diez monosacáridos que pueden ser separados por hidrólisis. Se designan disacáridos, trisacáridos, tetrasacáridos, etc., según el número de unidades componentes. Dentro de este grupo, los representantes de mayor interés son disacáridos. Se obtienen al estado cristalino, son solubles en agua y, en general, poseen sabor dulce.

c) *Polisacáridos*. Son moléculas de gran tamaño, constituidas por la unión de numerosos monosacáridos dispuestos en cadenas lineales o ramificadas. En general, los polisacáridos son compuestos amorfos, insolubles en agua e insípidos.

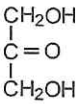
MONOSACÁRIDOS

Los azúcares simples responden a la definición de polihidroxialdehídos (aldehídos polialcoholes) o polihidroxicetonas (cetonas polialcoholes). En general, los glúcidos se distinguen con el sufijo "osa". Cuando poseen función aldehído, los monosacáridos se llaman *aldosas*; si tienen función cetona, *cetosas*. También se acostumbra designarlos triosas, tetrosas, pentosas, hexosas, de acuerdo con el número de carbonos en su molécula. Comúnmente se suele combinar en el nombre la indicación del número de carbonos y la función. Así, una aldohexosa es un monosacárido con una función aldehído y seis carbonos, una cetopentosa tiene una función cetona y cinco carbonos.

Los monosacáridos más simples son triosas, de las cuales existen una aldotriosa, el gliceraldehído, y una cetotriosa, la dihidroxiacetona.



Gliceraldehído
(Aldotriosa)



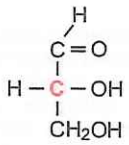
Dihidroxiacetona
(Cetotriosa)

Las tetrosas, pentosas, hexosas, etc., se consideran derivadas de estas triosas por sucesiva adición de grupos =CHOH, en cadena lineal, entre el grupo aldehído o cetona y la función alcohólica adyacente.

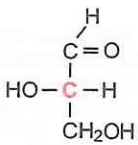
Los monosacáridos son sustancias *reductoras*, particularmente en medio alcalino. El grupo carbonilo es responsable de esta propiedad. Algunas reacciones de reconocimiento de monosacáridos utilizadas en el laboratorio aprovechan esa capacidad reductora.

Isomería

En el gliceraldehído, el segundo carbono es asimétrico o quiral, es decir, sus cuatro valencias están saturadas por grupos funcionales diferentes, lo cual determina la existencia de dos isómeros ópticos. Uno de los isómeros desvía la luz polarizada en el sentido de las agujas del reloj, es dextrorrotatorio o dextrógiro y se lo designa con la letra D antes del nombre. El otro es levorrotatorio o levógiro y se lo denomina L. Ambos compuestos son *enantiómeros*, uno es la imagen especular del otro, son *"antípodas ópticos"*.



D(+)-Gliceraldehído
(dextrógiro)



L(-)-Gliceraldehído
(levógiro)

En rojo se indica el carbono asimétrico

Por convención, en las fórmulas desarrolladas se representa al D-gliceraldehído con el hidroxilo del carbono asimétrico hacia la derecha y al compuesto L, con ese –OH hacia la izquierda (ver pág. 25).

Las aldotetrosas pueden considerarse derivadas del gliceraldehído por adición de un grupo =CHOH entre el aldehído y el alcohol secundario inmediato. Al agregar este grupo, se origina un nuevo centro quiral; la aldotetrosa tendrá dos C asimétricos. Si a una aldotetrosa se le suma otro =CHOH, se tiene una aldopentosa con tres C quirales. La aldohexosa generada por adición de otra función alcohol secundario a una aldopentosa, posee cuatro C asimétricos. Los distintos isómeros formados en cada caso no son enantiómeros porque no son la imagen especular uno de otro; se denominan *diastereoisómeros*.

El número de isómeros ópticos posibles se calcula con la fórmula 2^n, donde n es igual al número de carbonos asimétricos. Existen cuatro aldotetrosas (2^2) (dos de ellas son diastereoisómeros, con dos enantiómeros cada una), ocho aldopentosas (2^3), dieciséis aldohexosas (2^4), etc.

Los isómeros ópticos difieren entre sí en el índice de rotación específica, valor constante y característico para cada uno.

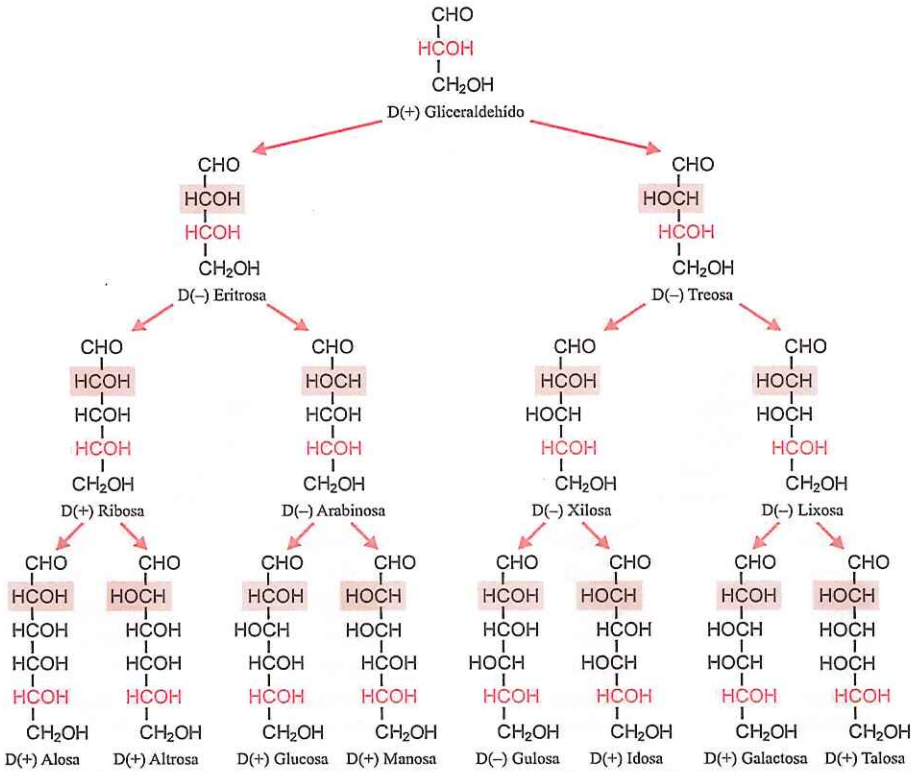
Como las aldosas se consideran derivadas del gliceraldehído, existen dos familias de estos monosacáridos: una relacionada con el D-gliceraldehído, y la otra con el L-gliceraldehído. En la tabla 4-1 se representan las aldosas derivadas del D-gliceraldehído. Todas ellas tienen la misma configuración en el alcohol secundario próximo a la función alcohol primario o, en otros términos, en el alcohol secundario más alejado de la función aldehído. En las fórmulas desarrolladas de la tabla 4-1 se representa hacia la derecha el OH de ese carbono, característica común a todas las aldosas de la "familia" o serie D.

La actividad óptica de un compuesto con varios carbonos asimétricos es la resultante de la interacción de todos ellos. Por esta razón, la notación D antepuesta al nombre de un azúcar de más de tres carbonos no indica necesariamente que sea dextrógiro, sino la configuración del C secundario más alejado de la función aldehído. Lo mismo se aplica a los monosacáridos de la serie L, antípodas ópticos de los D. La actividad óptica del compuesto se debe indicar con un signo (+) o (–) a continuación de D o L. Así, D(+)-glucosa indica a una aldohexosa de la serie D con capacidad dextrorrotatoria.

Para las cetosas también se considera la existencia de dos series, D y L, según la configuración del carbono secundario más alejado de la función cetona. La tabla 4-2 representa las cetosas de la serie D. La notación D sólo indica la "familia" o serie a la cual pertenece el compuesto, no necesariamente el signo de la rotación que imprime a la luz polarizada. Por ejemplo, la cetohexosa D-fructosa es fuertemente levógira y le corresponde la notación D(-)fructosa.

La diferenciación de los glúcidos en estas series o "familias" tiene importancia biológica. Los

Tabla 4-1. Aldosas serie D.



La serie es generada a partir de D-gliceraldehído por adiciones sucesivas de un grupo =CHOH inmediato a la función aldehído (señalado sobre fondo rosado). Las orientaciones posibles en el grupo agregado originan isómeros que no son antípodas ópticos, sino diastereoisómeros. La configuración del alcohol secundario más alejado de la función aldehído (en rojo) es, en todos los miembros de la familia, igual a la del D-gliceraldehído. Para cada compuesto de la serie D aquí representado existe el enantiómero correspondiente de la serie L.

organismos superiores prácticamente sólo utilizan y sintetizan glúcidos de la serie D. Son muy escasos los compuestos de la serie L presentes en estructuras celulares o en humores orgánicos del ser humano.

Monosacáridos de interés en bioquímica humana

No todos los monosacáridos presentados en las tablas 4-1 y 4-2 tienen importancia desde el punto de vista de la bioquímica del ser humano. Sólo consideraremos algunos de ellos.

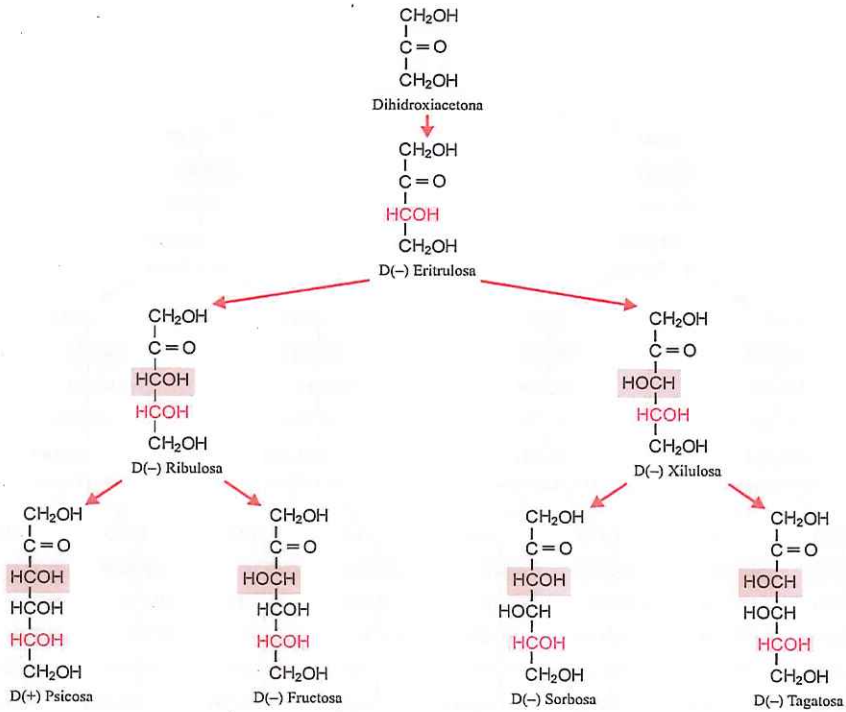
Las dos triosas, gliceraldehído y dihidroxiacetona, son compuestos de interés; como ésteres de fosfato se generan en el organismo durante transformaciones metabólicas de hidratos de carbono y otras sustancias.

Entre las aldopentosas mencionaremos la ribosa y entre las aldohexosas, glucosa, galactosa y manosa. Fructosa es la cetosa de mayor importancia.

Glucosa

Llamada también *dextrosa* en razón de sus propiedades dextrorrotatorias, es el monosa-

Tabla 4-2. Cetosas serie D.



cárido más abundante y de mayor importancia fisiológica, utilizado como combustible por las células.

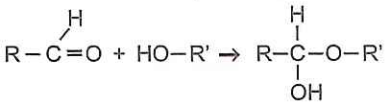
Se encuentra libre en la miel, en frutos maduros y también en sangre y humores orgánicos de los vertebrados.

La unión de muchas moléculas de glucosa forma polisacáridos como almidón, celulosa, glucógeno, etc. También integra disacáridos de interés, entre ellos sacarosa y lactosa.

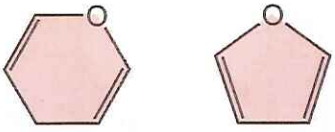
Estructura cíclica. Se ha presentado a los monosacáridos como aldehídos o cetonas con cadena lineal de carbonos. Sin embargo, esa estructura no explica algunas de las propiedades observadas en estas sustancias. Por ejemplo, casi todos estos azúcares no dan en forma inmediata las reacciones características de las funciones aldehído o cetona. Además, es posible comprobar la existencia de dos formas cristalinas de ciertos monosacáridos. Para el caso de la glucosa, se conocen una forma alfa y otra beta que difieren en su índice de rotación específica; el de α-D-glucosa es +112,2° y el de β-D-glucosa, +18,7°. Las dos formas muestran el fenómeno de *mutarrotación*: cuando se prepara una solución de α-D-glucosa en agua y se determina de inmediato la rotación específica, se comprueba un valor de +112,2°. Si se deja estacionar la solución, se observa disminución progresiva del índice y, al cabo de cierto tiempo, se estabiliza en +52,7°. La β-D-glucosa, en solución acuosa reciente, tiene una rotación específica de +18,7°, pero en mediciones posteriores, ese valor aumenta hasta detenerse en +52,7°.

La existencia de formas α y β, así como la reactividad anómala del grupo aldehído o cetona de los monosacáridos, se debe a la formación de moléculas cíclicas. La orientación de los enlaces entre carbonos determina aproximación de los extremos de la cadena. La función aldehído del primer carbono queda cercana al hidroxilo

del carbono 5, y puede formar una unión tipo hemiacetal (un hemiacetal resulta de la reacción entre aldehído o cetona y alcohol):



Se genera así un anillo heterocíclico de seis elementos (fig. 4-1). En ciertos casos, el hemiacetal se produce entre los carbonos 1 y 4, dando origen a un anillo de cinco elementos, cuatro carbonos y un oxígeno. Los anillos con ciclo hexagonal se consideran derivados del ciclo heterocíclico *pirano* y aquellos con anillo pentagonal, del *furano*. Por esto se refiere a formas *piranosa* o *furanosa* de monosacáridos, según la conformación que adopten. En solución, la piranosa es más estable; sin embargo, suelen encontrarse en la naturaleza azúcares en forma furanosa.



Ciclo pirano Ciclo furano

En la estructura cíclica expuesta, el carbono 1 no posee ya la función aldehído. Sin embargo, por ruptura del ciclo se regenera esta función. Es por ello que las reacciones típicas de aldehídos se dan con mayor lentitud en estos azúcares. Se dice que el carbono 1 de las aldosas cíclicas posee una función aldehído potencial, responsable de la capacidad reductora de estos glúcidos. Por otra parte, la estructura cíclica explica la existencia de formas α y β de azúcares y el fenómeno de mutarrotación. El carbono 1 en las formas cíclicas es asimétrico;

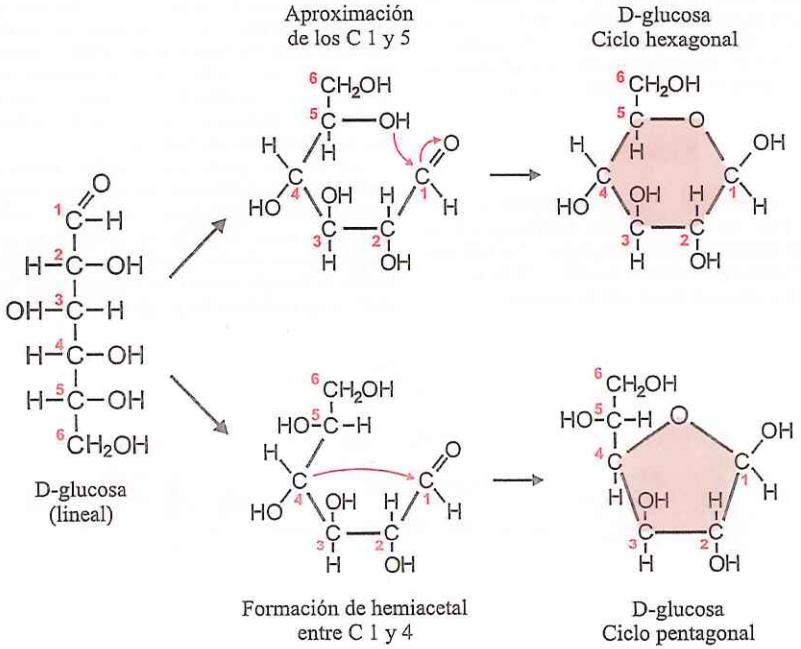


Fig. 4-1. Ciclización de glucosa.

Fig. 4-2. Formas de glucosa. En rojo, el C1 anomérico.

por lo tanto, existen dos configuraciones posibles (fig. 4-2).

A este tipo de isómeros se los denomina *anómeros* y el C1 es referido como *carbono anomérico*.

Se acostumbra representar la forma α con el OH del carbono 1 hacia abajo y la forma β, con el OH hacia arriba.

Cuando se disuelve glucosa α en agua, una parte de las moléculas se convierten en forma β, y se modifica el índice de rotación específica (mutarrotación). Cuando 2/3 de las moléculas en la solución están en forma β y 1/3 en forma α, se alcanza el equilibrio. La mezcla tiene un índice de +52,7° típico de soluciones estacionadas de glucosa. A esta misma situación de equilibrio se llega si originariamente se disuelve glucosa β.

Galactosa

Esta aldohexosa excepcionalmente se encuentra libre en la naturaleza. Comúnmente se asocia en moléculas más complejas. Con glucosa forma el disacárido lactosa o azúcar de leche. La galactosa es menos dulce que la glucosa.

Es epímero de glucosa, difiere en la configuración del C4. Presenta forma cíclica piranosa y, por lo tanto, anómeros α y β (fig. 4-3).

Manosa

Es una aldohexosa integrante de oligosacáridos asociados a glicoproteínas en organismos animales. También se la obtiene por hidrólisis de polisacáridos vegetales llamados mananos. Es epímero de glucosa; difiere de ella en la configuración del carbono 2 (fig. 4-4).

Fructosa

Cetohexosa, también llamada levulosa debido a sus propiedades levorrotatorias; su índice de rotación específica es –92,4°. Se encuentra libre en frutos maduros, en otros órganos de vegetales y en la miel. Con glucosa forma sacarosa o azúcar de caña. La fructosa libre tiene mayor poder edulcorante que la sacarosa y mucho más que la glucosa. Gracias a esta propiedad, la fructosa es utilizada en la elaboración de bebidas carbonatadas y golosinas. A estos fines, se produce en gran escala a partir de almidón de maíz, el cual es hidrolizado a glucosa y ésta convertida en fructosa por isomerización enzimática.

La fructosa posee una función cetona en el carbono 2. En productos naturales que contienen fructosa, ésta adopta forma cíclica, por unión hemicetálica entre C2 y C5. Se establece así un anillo pentagonal similar al del ciclo *furano*. De este modo, la función cetona del carbono 2 es "potencial", responsable de las propiedades reductoras de

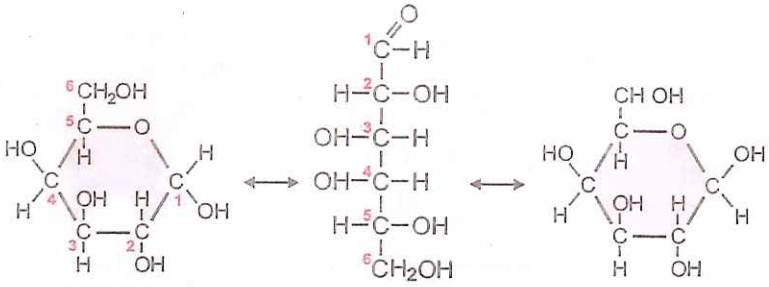


Fig. 4-3. Formas de galactosa.

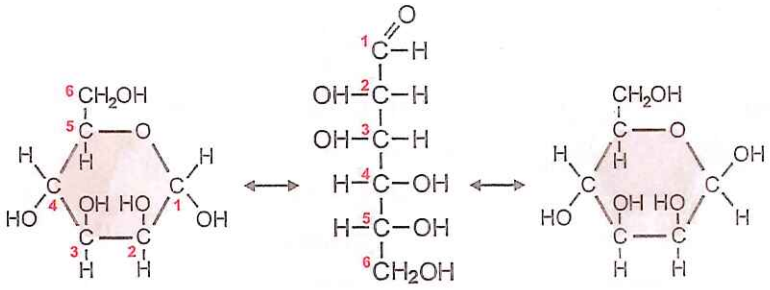


Fig. 4-4. Formas de manosa.

fructosa. Hay dos configuraciones posibles a nivel del carbono 2 en la forma cíclica, α y β (fig. 4-5).

En moléculas complejas en cuya constitución participa la fructosa, ésta se encuentra preferentemente en la forma furanosa. En cambio, en soluciones de fructosa libre predomina la forma piranosa.

Pentosas

La de mayor importancia es la aldopentosa *D-ribosa*, componente de ácidos ribonucleicos (ARN) y otras sustancias de gran interés biológico.

En la naturaleza se encuentran en forma cíclica tipo furanosa y, por lo tanto, presentan anómeros α y β (fig. 4-6).

Fórmulas de Haworth

Haworth propuso representar los anillos pirano y furano de monosacáridos como un plano y considerar los elementos o grupos funcionales unidos a los carbonos del anillo, ubicados arriba o debajo de ese plano. En la formulación de Haworth, se omiten los carbonos integrantes del anillo y se procura representar en relieve el lado del hexágono o del pentágono próximo al lector, para dar sensación del plano visto en perspectiva (fig. 4-7).

La representación de Haworth no es enteramente correcta, pues los átomos integrantes del anillo no están, en realidad, situados en el mismo plano. La molécula tiende a adoptar conformaciones de menor energía; para el anillo piranosa, las conformaciones llamadas "*silla*" y "*bote*" (fig. 4-8).

La forma "silla" C1 es más favorable desde el punto de vista termodinámico, razón por la cual es más estable. En estas conformaciones, los dos enlaces que restan a los carbonos del anillo se proyectan en dos direcciones: perpendicular al plano primitivo del ciclo (axiales), o aproximadamente en la misma dirección de ese plano (ecuatoriales), a y e respectivamente en la figura 4-8.

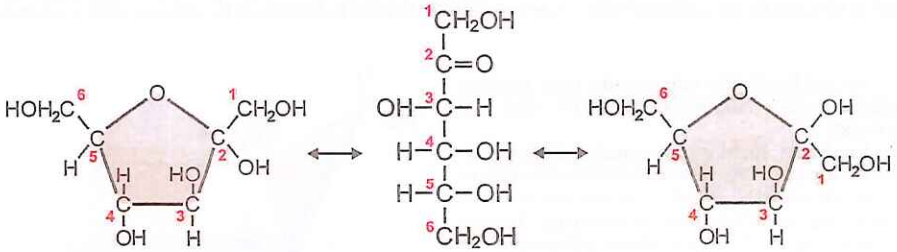


Fig. 4-5. Formas de fructosa.

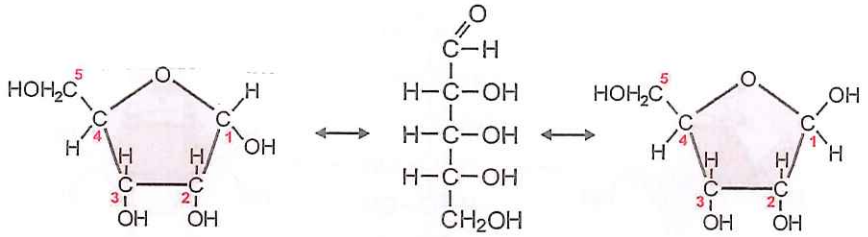


Fig. 4-6. Formas de ribosa.

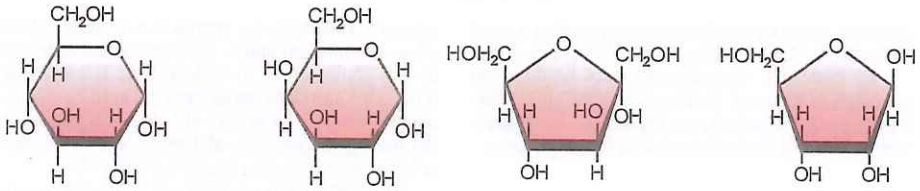


Fig. 4-7. Fórmulas de Haworth.

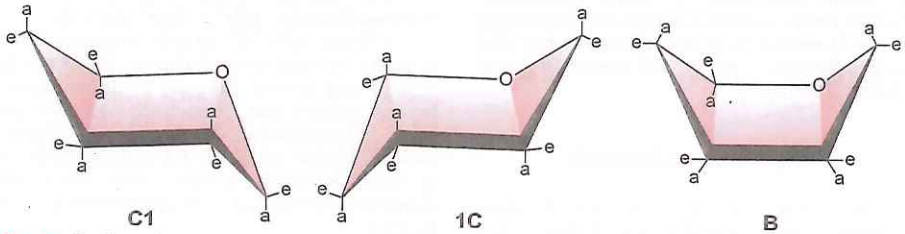


Fig. 4-8. Conformaciones del anillo piranósico. La de la izquierda (C1) y la del centro (1C) corresponden a las formas "silla", la de la derecha (B), a la forma "bote". C1 es la más estable. Se indica la dirección de los enlaces, a: axial, e: ecuatorial.

La conformación más común para glucopiranosa y otros monosacáridos es C1 (figs. 4-9 y 4-10).

La forma furanosa de monosacáridos tampoco es plana. Uno de los carbonos del ciclo se aparta del plano en el cual se encuentran los otros cuatro átomos, dando una conformación llamada "*sobre*" (fig. 4-11). En la ribosa componente de ácidos ribonucleicos el C3' está fuera del plano, del mismo lado que el C5' (forma llamada $C_{3'}$-endo). En la desoxirribosa de ácido desoxirribonucleico, C2 se encuentra separado del plano, es la forma $C_{2'}$-endo.

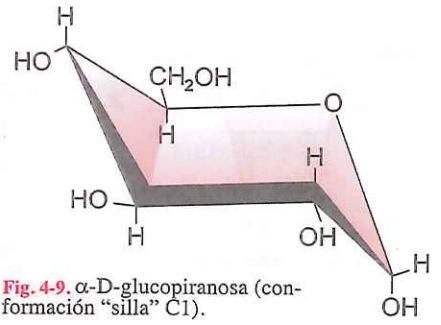


Fig. 4-9. α-D-glucopiranosa (conformación "silla" C1).

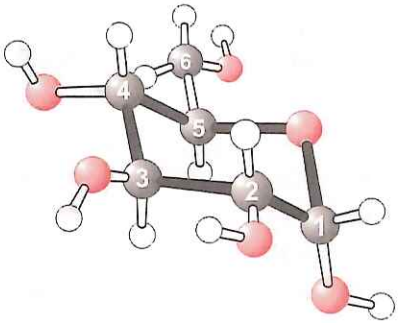


Fig. 4-10. α-D-glucopiranosa (conformación "silla" C1). Modelo de esferas y varillas. C: negro, O: rojo, H: blanco.

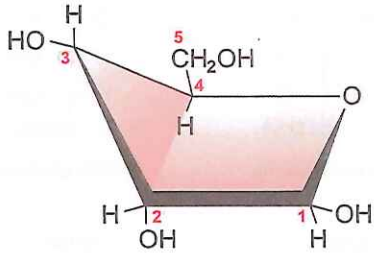
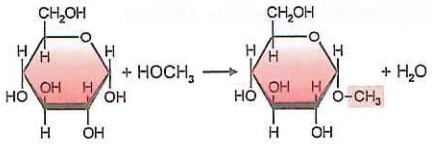


Fig. 4-11. Conformación "*sobre*" de furanosa (forma C_3, endo).

Derivados de monosacáridos

Glicósidos

El carbono hemiacetálico de aldosas y cetosas puede reaccionar con otra molécula para formar un compuesto designado con el nombre genérico de *glicósido*. Por ejemplo, si se hace reaccionar metanol con D-glucosa en medio ácido, se establece, con pérdida de agua, una unión entre el carbono 1 de la glucosa y el alcohol:



α-D-glucosa Metanol α-D-metil-glucósido

Se habla de glicósido o de unión glicosídica cuando está comprometido el carbono hemiacetálico de aldosas o el hemiacetálico de cetosas. Según la configuración del monosacárido original, pueden formarse dos tipos de glicósidos, α o β. La unión con el grupo agregado es de tipo α o β glicosídica respectivamente. Una vez formado el glicósido, las formas α y β no se interconvierten, es decir, no presentan el fenómeno de mutarrotación. Por otra parte, las reacciones del aldehído o cetona potencial dejan de ser evidentes. Estos compuestos no son reductores.

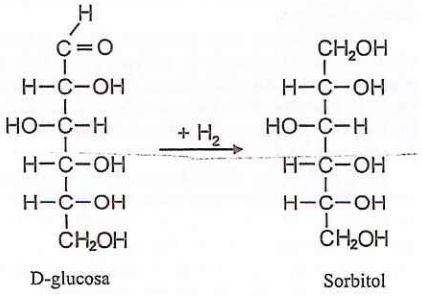
Cuando el monosacárido es glucosa, estos compuestos se designan *glucósidos*. Si es galactosa, *galactósidos*; si es fructosa, *fructósidos*, etc.

Los monosacáridos también establecen unión glicosídica entre sí, como en los oligo- y polisacáridos que consideraremos más adelante.

Cuando la molécula unida al carbono hemiacetálico del monosacárido no es de carácter glucídico, se da el nombre de *aglicona* a esa porción del glicósido. La aglicona puede ser muy simple, como en el caso presentado arriba (metilo), o mucho más complejo. Un conjunto de glicósidos de gran interés médico, pues se utilizan como "tónicos" cardíacos (digitálicos, ouabaína), tienen como aglicona una estructura de tipo esteroide.

Productos de reducción de hexosas

Por reducción del grupo aldehído o cetona (con hidrógeno a presión en presencia de un catalizador), se forma el polialcohol correspondiente. La glucosa origina el hexa-alcohol llamado *sorbitol*, la ribosa el *ribitol*, que integra la molécula de vitamina B_2 o riboflavina. Lógicamente, este tipo de compuestos no puede adquirir forma cíclica pues ha perdido la función capaz de formar unión hemiacetálica.



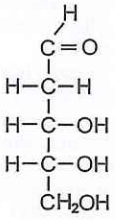
D-glucosa Sorbitol

Desoxiazúcares

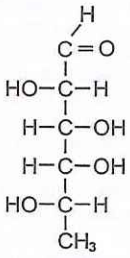
Son derivados de monosacáridos por pérdida de oxígeno de uno de los grupos alcohólicos. El

más abundante en la naturaleza es la *2-desoxirribosa*, producto resultante de la sustracción del oxígeno unido al carbono 2 de la aldopentosa ribosa. Es un derivado de importancia, pues participa en la constitución de ácido desoxirribonucleico (ADN).

Fucosa es un desoxiazúcar que participa en la constitución de moléculas complejas como glicoproteínas de animales superiores y de paredes celulares bacterianas. El compuesto que se encuentra en la naturaleza pertenece a la serie L y puede considerarse derivado de L-galactosa, por pérdida del oxígeno en el carbono 6 (6-desoxi-L-galactosa).



2-desoxi-D-ribosa



L-fucosa

Otra desoxihexosa que se encuentra en gomas y mucílagos vegetales y en glicoproteínas animales, es la *ramnosa*, derivado de L-manosa (6-desoxi-L-manosa).

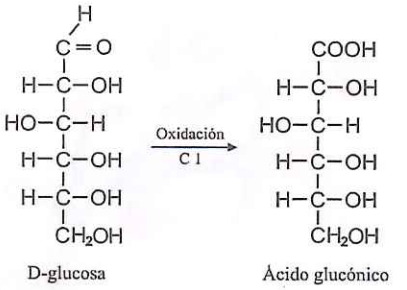
Productos de oxidación de aldosas

Bajo la acción de oxidantes suaves, la función aldehído se oxida a carboxilo y se originan *ácidos aldónicos*. El ácido aldónico formado por oxidación del carbono 1 de glucosa es designado *ácido glucónico*.

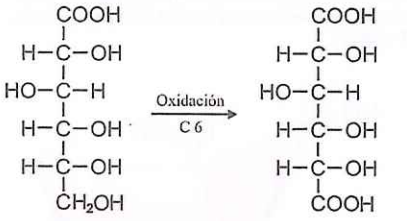
Una oxidación más enérgica afecta a ambos carbonos terminales de la aldosa (C1 y C6) originando ácidos dicarboxílicos. Estos diácidos reciben el nombre de *ácidos sacáricos* o *aldáricos*. El derivado de glucosa recibe el nombre de *ácido glucárico* o *glucosacárico*.

En condiciones controladas, con el carbono 1 protegido, se obtiene oxidación del carbono 6. Se originan así *ácidos urónicos*, derivados de aldosas con carboxilo en C6. Forman parte de polisacáridos complejos. El ácido urónico generado a partir de glucosa recibe el nombre de *ácido glucurónico*.

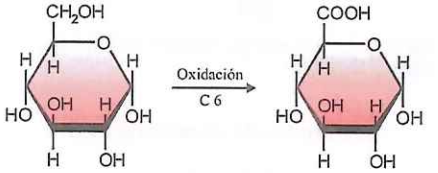
De todos los derivados por oxidación, obviamente sólo pueden existir en la forma cíclica los ácidos urónicos, ya que la reacción no afecta en ellos la unión hemiacetálica.



D-glucosa — Ácido glucónico



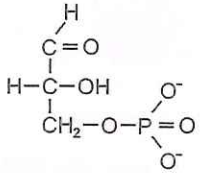
Ácido glucónico — Ácido glucárico



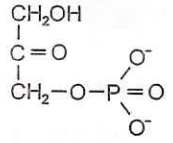
α-D-glucosa — Ácido α-D-glucurónico

Ésteres fosfóricos

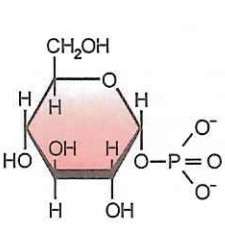
En muchas reacciones biológicas se producen ésteres de monosacáridos con ácido fosfórico. La formación de estos ésteres es denominada *fosforilación*; en general, es el primer paso en la utilización de monosacáridos en el organismo. A continuación se presentan algunos:



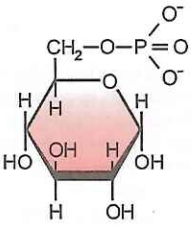
D-gliceraldehído-3-fosfato



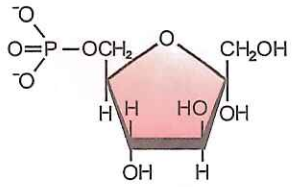
Dihidroxiacetona-fosfato



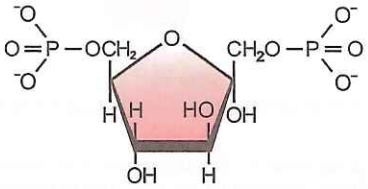
α-D-glucosa-1-fosfato



α-D-glucosa-6-fosfato



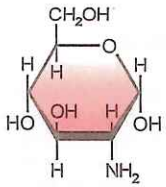
α-D-fructosa-6-fosfato



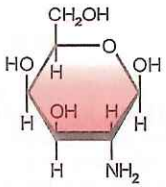
α-D-fructosa-1,6-bisfosfato

Aminoazúcares

En ellos se ha sustituido un hidroxilo del monosacárido por un grupo amina. Los más comunes en la naturaleza son *glucosamina* y *galactosamina*, en las cuales el grupo amina se une al carbono 2. Forman parte de polisacáridos y glicolípidos complejos y frecuentemente están acetilados en el grupo amina. Un derivado acetilado de glucosamina es la unidad constituyente de quitina, polisacárido muy abundante en la naturaleza.



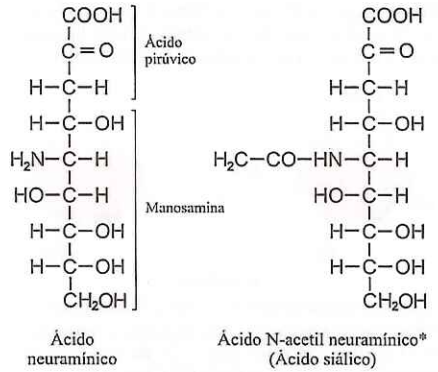
α-D-glucosamina



α-D-galactosamina

Otros compuestos nitrogenados relacionados con hexosas son *ácido neuramínico* y *ácido murámico*.

Ácido neuramínico es importante componente de cadenas de polisacáridos en glicoproteínas y glicolípidos de membranas celulares. Este compuesto de nueve carbonos puede considerarse formado por el aminoazúcar manosamina y ácido pirúvico. Generalmente se encuentra acilado en el N formando *ácidos siálicos*. El ácido siálico más común es el N-acetil-neuramínico, uno de los ácidos orgánicos más fuertes en seres vivientes ($pK_a = 2,6$).

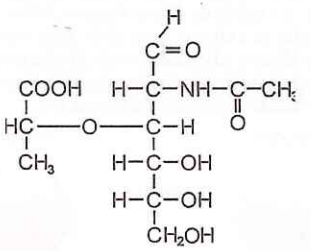


Ácido neuramínico

Ácido N-acetil neuramínico* (Ácido siálico)

* La letra N indica que el resto acetilo está unido al nitrógeno

Ácido murámico, formado por D-glucosamina con su C3 unido al C2 de ácido láctico (enlace éter). Un derivado acetilado de ácido murámico, el ácido N-acetil-murámico, es componente de polisacáridos de paredes bacterianas.



Acido N-acetilmurámico*

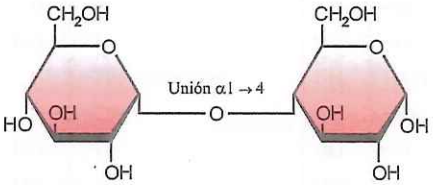
* La letra N indica que el resto acetilo está unido al nitrógeno

DISACÁRIDOS

Los disacáridos se forman por unión de dos monosacáridos con pérdida de una molécula de agua. Describiremos los de mayor interés en bioquímica humana.

Maltosa

También llamado azúcar de malta, es producto de hidrólisis del almidón catalizada por la enzima amilasa. Es algo dulce y muy soluble en agua, formada por unión del carbono 1 de α-D-glucosa (unión α-glucosídica) al carbono 4 de otra D-glucosa. Se produce durante la elaboración de la cerveza y se la encuentra en bebidas derivadas (malta).



α-maltosa

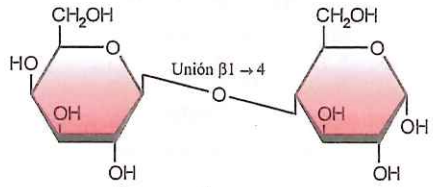
O-α-D-glucopiranosil-(α1 → 4)-α-D-glucopiranosa*

* Nombre de acuerdo con la nomenclatura actual. La letra O al comienzo indica que el C1 de la glucosa de la izquierda está unido al oxígeno del C4 de la otra.

El aldehído potencial de una de las glucosas queda libre; el disacárido es reductor y puede existir en formas α y β.

Lactosa

Se encuentra en la leche. Por hidrólisis origina los monosacáridos constituyentes: galactosa y glucosa. La unión de estos monosacáridos se establece entre el carbono 1 de β-D-galactosa (unión β-glicosídica) y el carbono 4 de D-glucosa. Como el carbono 1 de la glucosa queda libre, el compuesto es reductor y presenta formas α y β.

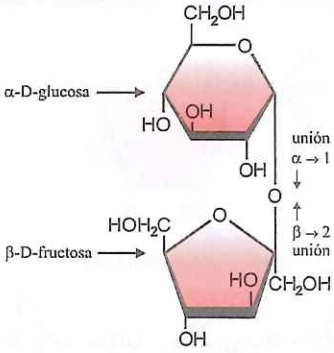


α-lactosa

O-β-D-galactopiranosil-(1 → 4)-α-D-glucopiranosa*

Sacarosa

Es el azúcar habitualmente utilizado como edulcorante en la alimentación. Se lo obtiene de caña de azúcar y remolacha. Está formada por glucosa y fructosa, unidas por un enlace doblemente glicosídico, ya que participan el carbono 1 de α-glucosa y el carbono 2 de β-fructosa. Ambos grupos, aldehído y cetona potenciales, están bloqueados y el disacárido no tiene capacidad reductora.



Sacarosa

β-D-fructofuranosil-(2 → 1)-α-D-glucopiranósido

La sacarosa es dextrógira; si se la somete a hidrólisis, resulta una mezcla equimolecular de glucosa y fructosa, en la cual predomina la acción levorrotatoria de fructosa sobre la dextrógira de glucosa. Como el sentido de la rotación se invierte, la mezcla de glucosa y fructosa resultante de la hidrólisis es llamada "*azúcar invertido*". La miel es, en gran parte, azúcar invertido.

Celobiosa. Disacárido resultante de la hidrólisis de celulosa, formado por dos glucosas unidas mediante enlace β-1→4.

Trehalosa. Disacárido no reductor compuesto por dos moléculas de α-D-glucosa ligadas por sus hidroxilos anoméricos (α-D-glucopiranosil-(1→1)-α-D-glucopiranósido).

POLISACÁRIDOS

Son sustancias mucho más complejas que los glúcidos hasta aquí considerados. Están constituidos por numerosas unidades de monosacáridos, unidas entre sí por enlaces glicosídicos. Algunos de ellos son polímeros de un solo tipo de monosacárido y reciben el nombre de *homopolisacáridos*, mientras otros dan, por hidrólisis, más de

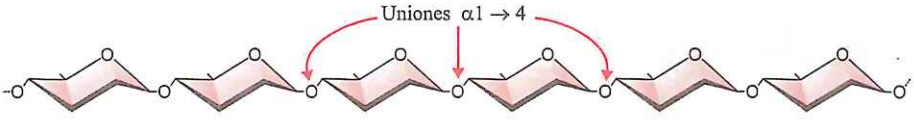


Fig. 4-12. Esquema de un segmento de molécula de amilosa.

una clase de monosacáridos; a éstos se los llama *heteropolisacáridos*. Todos son denominados genéricamente *glicanos*. La mayoría de los glicanos son compuestos amorfos, blancos, insípidos, no reductores. El tamaño de la molécula es en general muy grande; pertenecen a la categoría de macromoléculas. Algunos son insolubles en agua, otros forman en ella dispersiones coloidales.

Homopolisacáridos

Se los denomina agregando el sufijo *ano* al nombre del monosacárido constituyente. Los homopolisacáridos formados por glucosas serán glucosanos o glucanos; por manosas, mananos, etc.

El tamaño de la molécula de estos polímeros no es constante como el de proteínas, que poseen un número definido de unidades componentes. La masa molecular de glicanos varía dentro de amplios límites, pues en el organismo constantemente se produce adición o sustracción de restos monosacarídicos según las necesidades.

Almidón

Reserva nutricia en vegetales, se deposita en las células formando gránulos cuya forma y tamaño varían según el vegetal de origen. El almidón es el principal hidrato de carbono de la alimentación humana. Se encuentra en abundancia en cereales, papa y ciertas legumbres.

Está compuesto por dos glucanos diferentes, *amilosa* y *amilopectina*. Ambos son polímeros de glucosa, pero difieren en estructura y propiedades. Generalmente el almidón contiene alrededor de 20% de amilosa y el resto es amilopectina. Esta proporción varía según el origen del almidón.

Amilosa. Compuesta por 1.000 a 5.000 unidades de D-glucosa, lo cual da una masa molecular entre 160 y 800 kDa. Las glucosas se asocian entre sí por enlaces glucosídicos tipo α desde el carbono 1 de una glucosa al carbono 4 de la siguiente (enlace α-1 → 4), formando largas cadenas (fig. 4-12).

Este tipo de unión permite una disposición helicoidal de la cadena, enrollada alrededor de un eje central. Cada vuelta de hélice abarca seis unidades glucosa (fig. 4-13). Los grupos hidroxilo de los restos monosacáridos se disponen hacia el exterior, lo cual deja el interior de la hélice convertido en un ambiente relativamente hidrófobo.

En agua, las moléculas de amilosa tienden a asociarse y precipitar, razón por la cual no forman suspensiones estables. La reacción con yodo es utilizada para el reconocimiento de almidón. La amilosa con yodo da un color azul intenso. El diámetro interno de la hélice de amilosa es suficientemente amplio para alojar moléculas de yodo. El complejo amilosa-yodo es responsable del color azul.

Amilopectina. Tiene mayor tamaño molecular que la amilosa; puede llegar a masas de hasta 100 millones de Da, lo cual implica polimerización de más de 600.000 glucosas. La estructura básica es similar a la de amilosa, es decir, está constituida por glucosas unidas por enlaces glucosídicos α de carbono 1 a carbono 4, pero se distingue por poseer ramificaciones. Las ramificaciones son cadenas lineales de unas 24 a 26 glucosas unidas entre sí por enlaces glucosídicos α-1 → 4, que se unen a una cadena central de es-

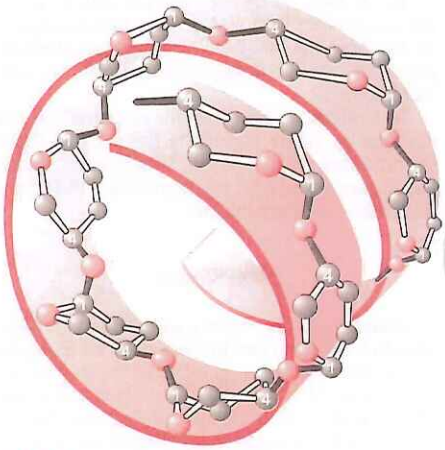


Fig. 4-13. Conformación helicoidal de la amilosa. Modelo de esferas y varillas. Sólo se representan los elementos del anillo pirano. En negro: C1 a C5; en rojo: oxígeno del ciclo y de la unión glucosídica α-1 → 4.

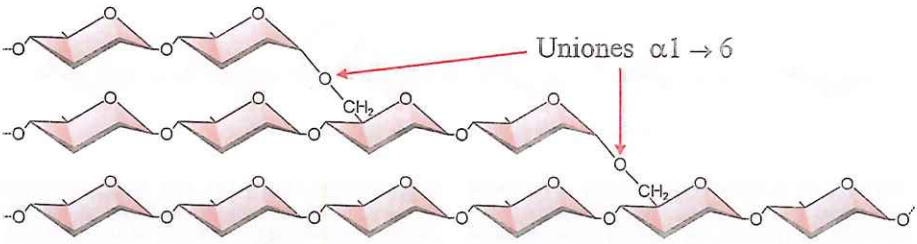


Fig. 4-14. Esquema de un segmento de amilopectina.

tructura similar, por unión glucosídica α desde el carbono 1 de la primera glucosa al carbono 6 de una glucosa en la cadena principal (enlace α-1 → 6). Las ramificaciones están separadas entre sí por unas diez unidades de glucosa de la cadena sobre la cual se insertan. De las ramificaciones primarias se desprenden, por enlaces α-1 → 6, otras secundarias y de éstas, ramas terciarias que tienen una extensión de 15 a 16 unidades. El esquema de la figura 4-14 indica la estructura de amilopectina.

Cuando se calienta almidón en agua, la amilopectina forma dispersiones de gran viscosidad. Los numerosos grupos hidroxilo en la superficie de la molécula atraen agua y se forma un gel estable (engrudo de almidón).

Las diferencias estructurales entre las moléculas de amilosa y amilopectina determinan que el complejo con yodo tenga distinta coloración; la amilopectina da color violeta.

El almidón no tiene capacidad reductora; las uniones glucosídicas en la molécula de amilosa o de amilopectina bloquean las funciones aldehído potencial (excepto una en un extremo de la cadena principal).

El almidón de los alimentos es degradado por enzimas de jugos digestivos hasta dejar libres sus unidades constituyentes. Sólo monosacáridos pueden ser absorbidos por la mucosa intestinal y utilizados por el organismo.

Glucógeno

Polisacárido de reserva en células animales. Hígado y músculo son los más ricos en glucógeno. Es almacenado en el citoplasma, en partículas de unos 21 nm de diámetro, constituidas por alrededor de 55.000 unidades de glucosa. Veinte a cuarenta de estas partículas se agrupan para formar rosetas, visibles al microscopio.

El glucógeno es un polímero de α-D-glucosas muy semejante a la amilopectina, es decir, presenta una estructura ramificada, con cadenas lineales de glucosas unidas por enlaces α-1 → 4, insertas en otras por uniones α-1 → 6. Su masa molecular alcanza a decenas de millones de Da. Las ramificaciones están separadas por menos de diez unidades glucosa de la cadena en la cual se insertan. La figura 4-15 es un esquema de un segmento de la molécula. Como su estructura es muy compacta debido a la proximidad de las ramificaciones, no forma geles pues no queda espacio para retener agua; en cambio, la amilopectina, con estructura ramificada más abierta, fija mayor cantidad de agua. Las dispersiones acuosas de glucógeno tienen aspecto opalescente. Da color rojo caoba con yodo; no es reductor.

Dextrinas

Cuando el almidón es parcialmente hidrolizado por acción de ácidos o enzimas (amilasas), se degrada a productos de menor tamaño molecular denominados *dextrinas*. Existe un tipo de dextrina, llamado "*dextrina límite*", producto remanente de la digestión con amilasa. Como esta enzima cataliza la hidrólisis de uniones α-1 → 4 y no afecta los enlaces α-1 → 6, su acción se detiene en los puntos de arranque de ramificaciones. Queda un resto inatacable por amilasa que es el límite de la acción de esta enzima; de allí su nombre.

Dextranos

Polisacáridos producidos por ciertos microorganismos son polímeros de D-glucosa con estructura ramificada; difieren de amilopectina y glucógeno en el tipo de enlaces. Las cadenas principales están formadas por glucosas en unión glucosídica α-1 → 6. Las ramificaciones se desprenden por uniones α-1 → 2, α-1 → 3 o α-1 → 4 según el tipo de dextrano.

Dextranos de masa molecular de alrededor de 75 kDa dan dispersiones de alta viscosidad

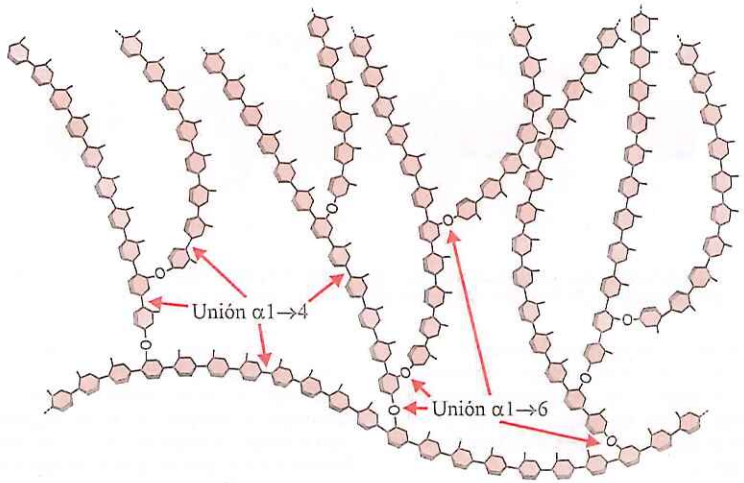


Fig. 4-15. Esquema de un segmento de molécula de glucógeno.

que tienen uso clínico. Se utilizan como sustitutos de emergencia del plasma sanguíneo. Sirven para restablecer la volemia en casos de pérdidas agudas de sangre o plasma, hasta tanto se pueda instituir el tratamiento transfusional adecuado.

Inulina

Polisacárido de reserva en tubérculos de dalia y raíz de alcaucil. Es un fructosano, formado por largas cadenas de fructosas unidas por enlaces glicosídicos β-2 → 1. Soluble en agua caliente; es utilizada en pruebas funcionales de riñón para medir filtración glomerular.

Celulosa

Glucano con funciones estructurales en vegetales; es uno de los componentes principales de paredes celulares. Se la encuentra en proporción importante en el salvado, legumbres, nueces, repollo. La pulpa de madera contiene alto porcentaje de celulosa y el algodón es prácticamente celulosa pura. Este polisacárido es el compuesto orgánico más abundante en la naturaleza. La industria procesa, para distintos fines, más de 800 millones de toneladas de celulosa por año.

Constituida por más de 10.000 unidades de glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos β-1→4. Su estructura es lineal, no posee ramificaciones. La diferencia en la geometría de los enlaces α-1→4 y β-1→4 es responsable de la distinta conformación de las moléculas de amilosa y celulosa, pese a ser ambos polímeros lineales de glucosa.

En las uniones β-1 → 4 de celulosa, cada unidad de glucosa gira 180° con respecto a la anterior (fig. 4-16). Esto permite formar largas cadenas rectilíneas, estabilizadas por uniones tipo puente de hidrógeno. En cambio, los enlaces α-1 → 4

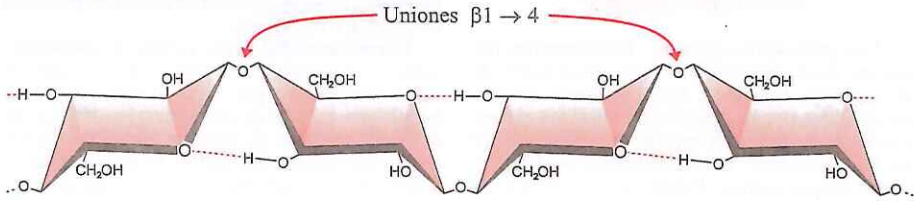


Fig. 4-16. Esquema de un segmento de molécula de celulosa. Cada unidad de glucosa gira 180° con respecto a la anterior. Nótense los puentes H que estabilizan la hebra del polímero.

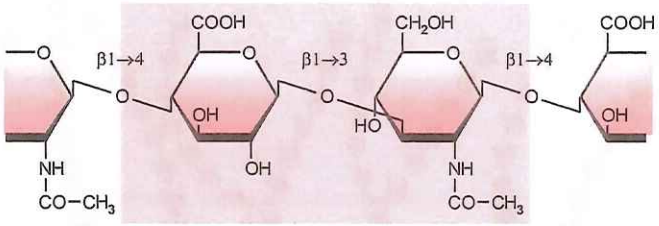


Fig. 4-17. Unidad estructural de ácido hialurónico (disacárido sobre rectángulo rosado). Ácido D-glucurónico-β-1 → 3-N-acetil-D-glucosamina. Al pH del organismo, la función carboxilo está ionizada ($-COO^-$).

de amilosa favorecen la conformación helicoidal. Las hebras de celulosa se agrupan paralelamente en haces que forman microfibrillas de gran resistencia física. A esta resistencia contribuyen los numerosos puentes de hidrógeno existentes entre cadenas vecinas.

Los jugos digestivos humanos no poseen enzimas capaces de catalizar la hidrólisis de uniones glucosídicas β. La celulosa que ingresa con los alimentos vegetales no es modificada en su tránsito por el tracto gastrointestinal.

Quitina

Es un polisacárido muy abundante en la naturaleza, ya que constituye el exoesqueleto de artrópodos tales como insectos y crustáceos. Está formada por N-acetil-D-glucosaminas unidas entre sí por enlaces glucosídicos β-1 → 4.

Heteropolisacáridos

Estos compuestos dan, por hidrólisis, más de un tipo de monosacárido o derivado de monosacáridos. Frecuentemente se asocian a proteínas formando grandes complejos moleculares.

Glicosaminoglicanos

Los glicosaminoglicanos, anteriormente llamados mucopolisacáridos, son compuestos de gran interés biológico. Son polímeros lineales constituidos por la sucesión de unidades estructurales disacarídicas formadas generalmente por un ácido urónico y una hexosamina. Suelen presentar grupos sulfato. Debido a la existencia de numerosos grupos ionizables de ácidos urónicos ($-COO^-$) y sulfatos ($-SO_3^-$) en la molécula, se comportan como polianiones.

Excepto heparina, intracelular, los restantes se encuentran en el espacio extracelular, principalmente en la sustancia fundamental del tejido conjuntivo. Existen varios tipos de glicosaminoglicanos, cuya estructura analizamos a continuación.

Ácido hialurónico. La unidad estructural es el disacárido formado por *ácido D-glucurónico* unido por enlace glucosídico β-1 → 3 a *N-acetil-D-glucosamina*. Cada unidad se une a la siguiente por un enlace β-1 → 4 (fig. 4-17).

El ácido hialurónico es el glicosaminoglicano de mayor masa molecular (de 100.000 a varios millones de Da). Forma soluciones muy viscosas (geles), con propiedades lubricantes. Se encuentra en la sustancia intercelular de tejido conjuntivo, especialmente en piel y cartílago, humor vítreo del ojo, gelatina de Wharton del cordón umbilical, líquido sinovial, etc.

Condroitinsulfato. La unidad disacarídica es semejante a la de ácido hialurónico, con *N-acetil-D-galactosamina* en lugar de N-acetil-D-glucosamina. Los tipos de enlace son los mismos. Se distingue además del ácido hialurónico por poseer sulfato ($-SO_3^-$) que esterifica el hidroxilo de C4 o C6 de la galactosamina. De acuerdo con la posición de este grupo se consideran dos tipos de condroitinsulfato, condroitín-4-sulfato o A (fig. 4-18) y condroitín-6-sulfato o C. Su masa varía entre 10 y 50 kDa. Son importantes componentes de cartílago, hueso, etc.

Dermatansulfato. Es similar a condroitinsulfato. La principal diferencia es el cambio de ácido glucurónico por ácido *L-idurónico*. Este compuesto resulta de epimerización del C5 de ácido glucurónico (la función carboxilo del C6 queda por debajo del plano del anillo pirano). Posee restos sulfato unidos a galactosamina en el C4 y/o C2 de ácido idurónico (fig. 4-19).

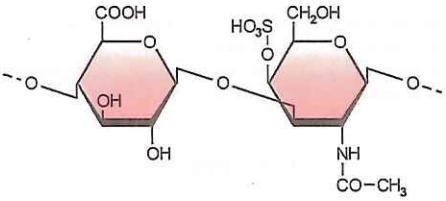


Fig. 4-18. Unidad estructural de condroitinsulfato A (condroitin- 4-sulfato). Ácido D-glucurónico-β1→3-N-acetil- D-galactosamina-4-sulfato. Al pH del organismo, las funciones carboxilo y sulfuro están ionizadas ($-COO^-$, $-SO_3^-$).

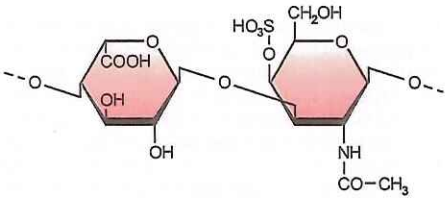


Fig. 4-19. Unidad estructural de dermatansulfato. Ácido L-idurónico-α-1 → 3-N-acetil-D-galactosamina-4-sulfato. Al pH del organismo, las funciones carboxilo y sulfato están ionizadas.

Era llamado condroitinsulfato B. Se encuentra en piel y tejido conjuntivo de diversos órganos.

Queratansulfato. Se diferencia de los anteriores por carecer de ácido urónico. La unidad estructural está formada por *galactosa* y *glucosamina acetilada*, esterificada por *sulfato* en el C6. Se encuentra en córnea y cartílago.

Heparina. La unidad disacárida es *ácido urónico* y *glucosamina* unidos por enlace β-1 → 4. Se encuentran *ácidos glucurónico* e *idurónico*, este último en mayor proporción. Muchos grupos amina de glucosaminas están sulfatados; unos pocos, acetilados. Los sulfatos se unen al C6 de glucosamina y al C2 del ácido urónico. La presencia de tantos restos sulfato otorga a este compuesto un carácter fuertemente ácido. Heparina es la macromolécula biológica con mayor densidad de cargas negativas. Los enlaces glicosídicos entre disacáridos son de tipo α-1 → 4 (fig. 4-20). Su masa molecular oscila entre 8 y 20 kDa. Se la encuentra en los gránulos de células cebadas de tejido conectivo.

En virtud de sus numerosas cargas negativas, la heparina tiene gran tendencia a interactuar con una variedad de proteínas, como enzimas, inhibidores de enzimas, proteínas de matriz extracelular, citoquinas, etc. Expresión de este tipo de interacciones es su acción anticoagulante tanto *in vitro* como *in vivo*, razón por la cual encuentra frecuente aplicación en medicina (ver pág. 701). Otra acción de heparina es el aclaramiento del plasma sanguíneo después de una comida rica en grasas. Las grasas se absorben en intestino y pasan a la sangre formando partículas llamadas quilomicrones, cuya presencia en cantidad da al plasma un aspecto lechoso. La heparina acelera la desaparición de esos quilomicrones de sangre circulante.

Heparansulfato. De estructura parecida a la heparina, generalmente más sulfatado que ella y con menor proporción de ácido idurónico. Tanto el heparansulfato como la heparina presentan gran diversidad en la secuencia de los monosacáridos constituyentes.

Está distribuido en superficies celulares y matriz extracelular. La interacción heparansulfato-proteínas es responsable de distintos procesos fisiológicos, como adhesión entre células, regulación de enzimas, acción de citoquinas, etc.

Fibra dietaria

Se incluye en la denominación *fibra dietaria* a diferentes componentes de vegetales que no son hidrolizados por las enzimas del tracto

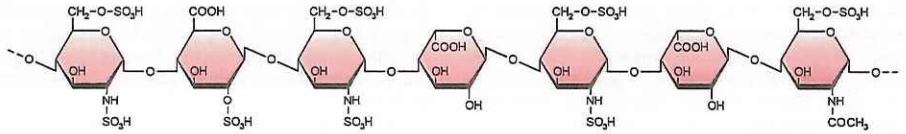


Fig. 4-20. Segmento de la molécula de heparina. Las unidades representadas, de izquierda a derecha, son: residuos 1°, 3° y 5°, α-D-glucosamina-2,6-sulfato; residuo 2°; ácido-β-D-glucurónico-2-sulfato; residuos 4° y 6°, ácido α-L-idurónico; residuo 7°, N-acetil-α-D-glucosamina-6-sulfato. Al pH del organismo, las funciones carboxilo y sulfato están ionizadas.

gastrointestinal humano. Algunas de ellas son homopolisacáridos como la celulosa, otras son heteropolisacáridos (hemicelulosas, pectinas, gomas, mucílagos) y otras, como la lignina, no son polisacáridos. En las paredes celulares de vegetales, que contienen la casi totalidad de la fibra dietaria, las fibrillas de celulosa están inmersas en una matriz que contiene además los heteropolisacáridos mencionados y proteínas de tipo fibroso. La composición de esta matriz varía en diferentes vegetales y aun en diferentes constituyentes de una misma planta.

Hemicelulosas. Son heteropolisacáridos formados por una cadena principal de aldosas (glucosa, galactosa, xilosa, manosa) unidas por enlaces β-1 $\rightarrow$ 4, de la que se desprenden múltiples ramificaciones o cadenas secundarias de arabinosa, galactosa, ácido glucurónico. La cadena principal se une por puentes de hidrógeno a la superficie de las microfibrillas de celulosa; las ramificaciones establecen uniones cruzadas entre esas microfibrillas y otros integrantes de la matriz (pectinas), formando una red responsable de la resistencia mecánica de las paredes celulares vegetales, en las que la hemicelulosa puede representar de 20 a 30% del total de componentes.

Pectinas. Son un grupo complejo de polisacáridos, constituidos por cadenas de ácidos galacturónicos unidos por enlaces α-1 $\rightarrow$ 4, a cuyos extremos se fijan cadenas cortas de otros monosacáridos (galactosa, fucosa, xilosa, ramnosa, arabinosa). Se encuentran en la pulpa de frutas (manzana, cítricos), raíces (remolacha, zanahoria) y tallos verdes. Estas moléculas con numerosas cargas negativas (restos carboxilo de ácidos urónicos) fijan cationes, principalmente Ca^{2+}, y atraen ávidamente moléculas de agua. Están altamente hidratadas y tienden a formar geles. Esta propiedad es utilizada en la industria de alimentos (jaleas, mermeladas) y cosméticos.

Gomas. Compuestas por una variedad de monosacáridos y derivados, frecuentemente galactosas, unidas en cadena lineal con enlaces β-1 $\rightarrow$ 3 y β-1 $\rightarrow$ 6, de la que se desprenden ramificaciones de ácidos urónicos, frecuentemente galacturónico, arabinosas, manosas. Son exudadas por vegetales o secretadas por éstos en sitios de lesión (goma arábiga, tragacanto). Dan soluciones altamente viscosas; son utilizadas en la industria de alimentos.

Mucílagos. Tienen una estructura y propiedades similares a las de pectinas; como ellas, tienen gran tendencia a formar geles.

Lignina. No es un polisacárido, pero está asociado a ellos en tejidos vegetales; forma parte de la fibra dietaria. Es un complejo polímero de restos fenólicos, altamente ramificado, con fuertes uniones intramoleculares. Responsable de la resistencia y densidad de la madera. Está presente también en raíces, trigo y semillas.

Proteoglicanos

Glicosaminoglicanos se asocian con proteínas para formar proteoglicanos. La unión se realiza por enlaces glicosídicos entre cadenas polisacarídicas y el hidroxilo de restos serina o N de restos asparragina de la proteína. Más de 100 cadenas de glicosaminoglicanos se insertan en cada una de proteína. A su vez, muchos de estos proteoglicanos se fijan, por un extremo de la cadena polipeptídica, a un tallo central de ácido hialurónico. La asociación entre éste y la proteína del proteoglicano se realiza mediante otra proteína intermediaria, llamada de "enlace" (fig. 4-21). Hasta 100 proteoglicanos pueden unirse a una cadena central de ácido hialurónico. Los enormes agregados moleculares que resultan, cuya masa alcanza a decenas de millones de Da, son visibles al microscopio electrónico.

Debido a la naturaleza polianiónica de los glicosaminoglicanos, estos complejos interactúan con otras macromoléculas. En tejido conjuntivo se unen por fuerzas electrostáticas a la proteína colágena. También tienen gran capacidad para atraer agua, a tal punto que gran parte del agua extracelular del organismo se encuentra fijada a estos proteoglicanos de tejido conjuntivo. El cartílago puede amortiguar fuerzas de compresión gracias a estos polianiones muy hidratados.

El conjunto de proteoglicanos forma un reticulado tridimensional que representa una barrera para el transporte extracelular de compuestos. Pueden contener condroitinsulfato, dermatansulfato o queratansulfato. La composición en glicosaminoglicanos de tejido conjuntivo de diferentes órganos varía. Además, también se producen cambios con la edad. Por ejemplo, en el cartílago de recién nacido la proporción de queratansulfato es muy reducida. La longitud de las cadenas y su cantidad relativa aumenta con la edad hasta llegar casi al 50% del peso total de glicosaminoglicanos en la vejez.

Un proteoglicano inserto en membranas celulares, el *sindecan*, formado por heparansulfato y condroitinsulfato, se une al colágeno y media en la adhesión de células de tejido conectivo a la matriz extracelular. También participa en la transmisión de señales a través de la membrana celular promoviendo el "reclutamiento" de ligandos en la superficie celular.

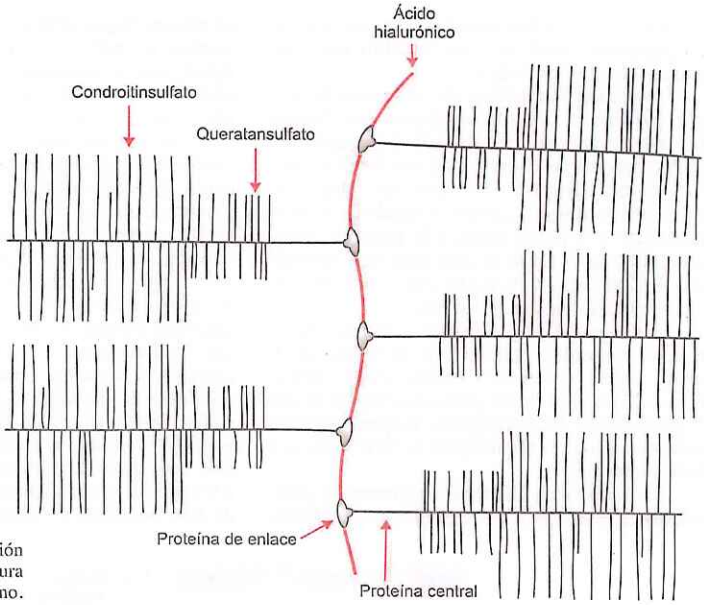


Fig. 4-21. Representación esquemática de la estructura de un trozo de proteoglicano.

La heparina forma un proteoglicano uniéndose a una proteína muy peculiar, constituida sólo por serinas y glicinas alternadas a lo largo de su cadena.

Peptidoglicanos

Las bacterias poseen, por fuera de la membrana celular, una pared resistente que las protege de cambios osmóticos y de otro tipo en el medio. Esta pared está formada por una enorme estructura molecular constituida por gran número de cadenas de un polisacárido cuyas unidades estructurales son N-acetil-D-glucosamina y ácido N-acetil-murámico. Las cadenas se disponen paralelamente y están unidas entre sí por pequeños trozos transversales de oligopéptidos. El conjunto tiene el aspecto de una densa trama o red que envuelve toda la bacteria. Esta estructura recibe el nombre de *mureína*.

En bacterias Gram negativas, sobre esta trama de peptidoglicano se encuentra otra cubierta rica en lípidos y proteínas hidrofóbicas a los cuales deben estos microorganismos su propiedad de no teñirse con colorante de Gram.

Uno de los antibióticos más útiles para combatir infecciones producidas por bacterias, la penicilina, actúa inhibiendo la síntesis de *mureína*.

Glicoproteínas

Son proteínas conjugadas con carbohidratos como grupo prostético. Esta definición también comprende a los proteoglicanos. Las glicoproteínas se diferencian de éstos porque sus cadenas glucídicas son más cortas (oligosacáridos), pueden ser ramificadas y generalmente dan, por hidrólisis, más de dos monosacáridos diferentes.

En las cadenas oligosacarídicas de glicoproteínas se encuentran D-galactosa, D-manosa, L-fucosa, D-xilosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, ácidos glucurónico, idurónico y siálicos. El número de cadenas oligosacarídicas en glicoproteínas es muy variable; algunas sólo poseen una (ovoalbúmina) y otras pueden llegar a tener 800 (glicoproteína de glándula submaxilar). Correlativamente, el porcentaje de hidratos de carbono varía entre el 5 y 85% de la molécula. Las glicoproteínas ricas en ácidos siálicos forman soluciones más viscosas y pueden actuar como lubricantes.

Son glicoproteínas: a) casi todas las proteínas de la cara externa de membrana plasmática de células animales (la porción glucídica de esas proteínas forma el llamado *glicocálix*); b) la mayor parte de las proteínas plasmáticas; c) proteínas excretadas por glándulas mucosas de tracto digestivo, respiratorio, genital, etc.; d) algunas

hormonas; e) muchas enzimas, etc. En general, las proteínas sintetizadas por la célula para "exportar" son glicoproteínas.

Diversidad estructural de oligosacáridos de glicoproteínas. Los oligosacáridos que forman las cadenas laterales de glicoproteínas tienen una estructura particular para cada una de ellas, pero hay ciertas características comunes. Restos N-acetil-glucosamina y galactosa tienden a situarse próximos al extremo fijado a la proteína, mientras los ácidos siálicos se disponen en el extremo distal. Casi siempre el ácido siálico está ubicado a continuación de una galactosa.

La unión del oligosacárido a la proteína se realiza por enlace glicosídico al hidroxilo de restos serina o treonina (unión O-glicosídica) (fig. 4-22) o al N de un resto asparragina (unión N-glicosídica). En el colágeno, pueden unirse hidratos de carbono al hidroxilo de hidroxilisina o hidroxiprolina.

El residuo más frecuente en uniones O-glicosídicas es N-acetil-D-galactosamina. En cambio, en enlaces N-glicosídicos está comprometido casi siempre un resto N-acetil-D-glucosamina. En la figura 4-22 se muestran ejemplos de cadenas de oligosacáridos unidos a restos serina (o treonina) por enlaces O-glicosídicos.

Los oligosacáridos con enlace N-glicosídico contienen un núcleo pentasacarídico común formado por dos residuos N-acetil-glucosamina y tres manosas (fig. 4-23). A este núcleo común se unen azúcares adicionales para dar una gran variedad de patrones diferentes. Los oligosacáridos fijados a N amídico de restos asparragina se clasifican en tres tipos, según la proporción de unidades manosa: a) de alto contenido de manosas; b) complejos, y c) híbridos. Los tres tipos comparten la misma estructura básica, formada por dos restos N-acetil-D-glucosamina y tres unidades manosa (fig. 4-23 A). En los de alto *contenido de manosas*, al núcleo básico se adicionan sólo moléculas de manosa. Contienen en total 5 a 9 restos de ese monosacárido (fig. 4-23 B). Los de *tipo complejo* contienen, sobre la estructura

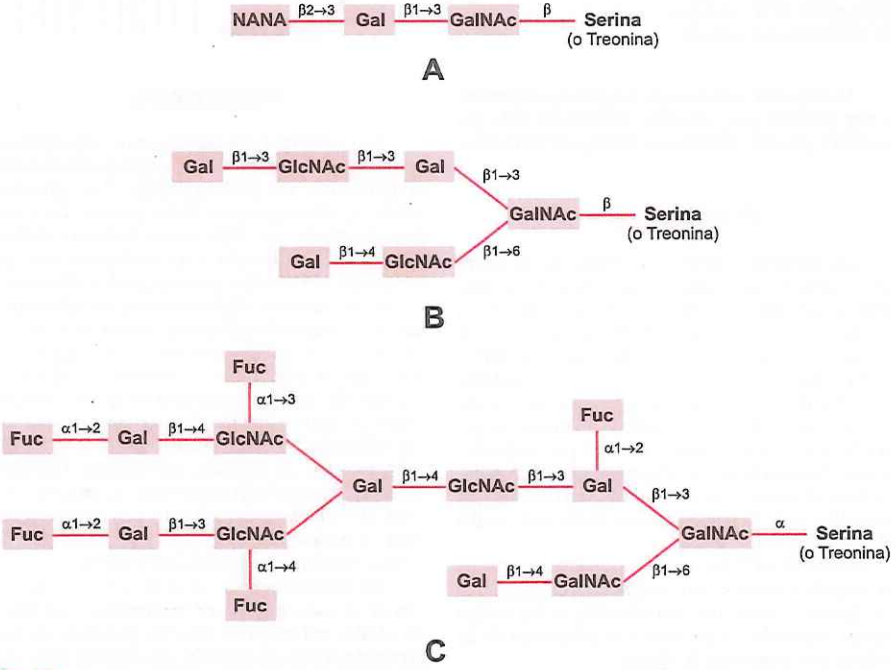


Fig. 4-22. Estructuras de oligosacáridos de glicoproteínas unidos por enlace O-glicosídico. A. Oligosacárido de glicoforina, glicoproteína de membrana de eritrocitos. B. Oligosacárido de mucina gástrica. C. Oligosacárido de mucina de glándula submaxilar. Referencias: NANA, ácido N-acetil-neuramínico; Gal, galactosa; GalNAc, N-acetil-D-galactosamina; GlcNAc, N-acetil-D-glucosamina; Fuc, fucosa.

básica, cantidades variables de otros residuos distintos de manosa, como N-acetil-D-glucosamina, galactosa, glucosa, fucosa, ácido siálico (fig. 4-23 C). En los *híbridos* o *mixtos*, sobre una de las manosas distales del núcleo común se agregan sólo manosas, y sobre la otra, cadenas de tipo complejo (fig. 4-23 D).

La multiplicidad de combinaciones posibles en las cadenas de los oligosacáridos no sólo depende de la secuencia de las unidades componentes o "estructura primaria", como en los polipéptidos, sino también de otras características peculiares de este tipo de polímeros: 1) El carbono anomérico (C1) puede presentar dos configu-

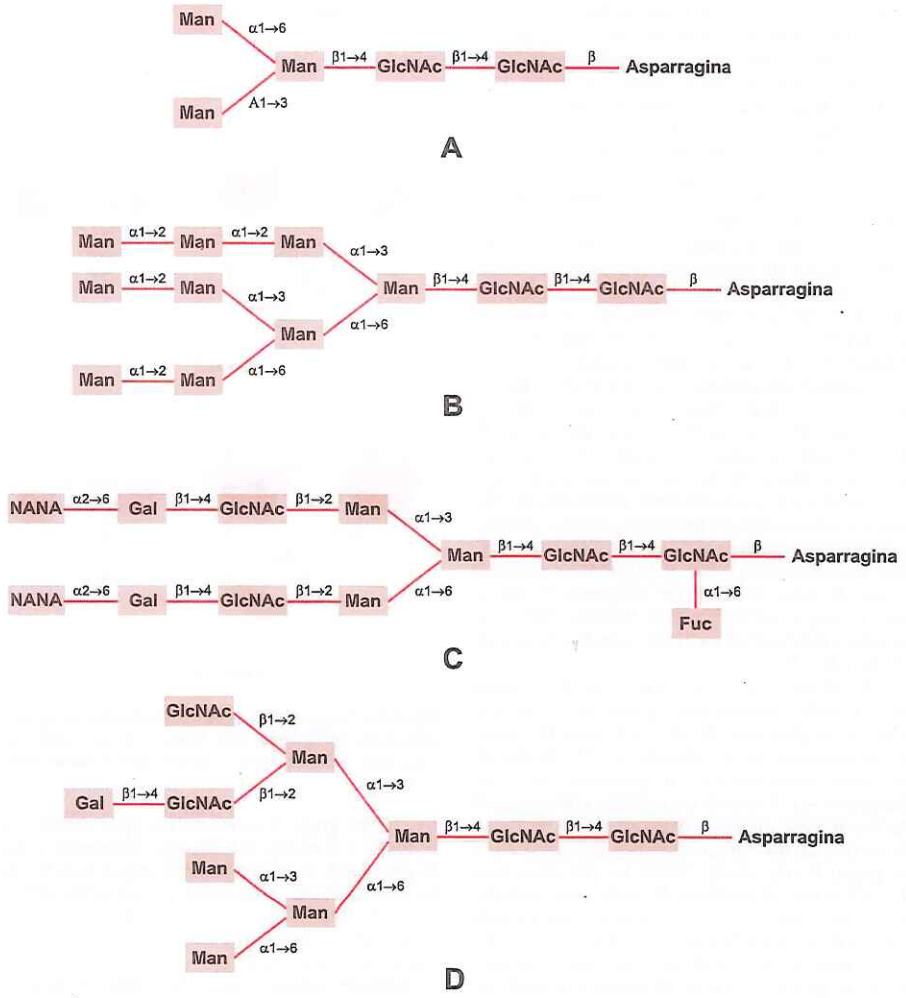


Fig. 4-23. Estructura de oligosacáridos unidos por enlace N-glicosídico a proteínas. A. Núcleo básico común a todos los oligosacáridos en unión N-glicosídica. B. Oligosacárido del tipo de alto contenido de manosas. C. Oligosacárido de tipo complejo. D. Oligosacárido de tipo híbrido. Referencias: Man, manosa; GlcAAc, N-acetil-glucosamina; NANA, ácido N-acetil-neuramínico; Gal: galactosa; Fuc: fucosa.

raciones (α y β), lo cual da lugar a dos clases diferentes de uniones glicosídicas. 2) Los enlaces glicosídicos pueden dirigirse a cualquiera de los grupos hidroxilo disponibles en cada resto monosacárido (C2, C3, C4, C6). 3) Son frecuentes las ramificaciones. Todos estos atributos estructurales ofrecen un repertorio muy amplio de posibilidades de construir oligosacáridos diferentes a partir de un conjunto de monosacáridos. Por esta razón, es mucho mayor la cantidad de ensambles teóricamente posibles con un número dado de monosacáridos, que de péptidos resultantes de la unión de igual número de aminoácidos.

Lectinas. Hace muchos años se descubrieron, en distintos vegetales, proteínas capaces de reconocer y unirse específicamente, con gran afinidad, a determinados mono- u oligosacáridos. Estas proteínas, llamadas *lectinas*, resultaron muy útiles para estudiar la constitución de los carbohidratos de superficies celulares. Posteriormente se comprobó que la distribución de este tipo de proteínas es muy amplia en la naturaleza. Se encuentran lectinas no sólo en vegetales, sino también en bacterias y tejidos animales.

Grupos sanguíneos. La superficie de glóbulos rojos y de otras células poseen glicoproteínas y glicolípidos que actúan como antígenos. El determinante antigénico (ver pág. 663) de esas moléculas reside en la porción glucídica, cuya estructura está genéticamente determinada. Según la composición de los oligosacáridos en estas moléculas es posible caracterizar diferentes grupos de individuos en una población. Se conocen varios de estos sistemas de antígenos en humanos; el mejor estudiado es el llamado AB0, que permite clasificar los individuos en cuatro grupos (A, B, AB y 0).

El antígeno 0 es un oligosacárido formado por N-acetil-glucosamina, galactosa y fucosa, unido a la galactosa de un resto lactosilo fijado a una ceramida en glicolípidos o al hidroxilo de un resto aminoacídico en glicoproteínas. Los antígenos A y B tienen los mismos componentes del 0 y además, ligada al resto galactosa terminal, N-acetil-galactosamina en el A y galactosa en el de grupo B (fig. 4-24). Todas las personas pueden sintetizar el antígeno 0, pero para completar las cadenas de A y B se requiere una enzima que catalice específicamente la transferencia del monosacárido adicional en cada caso. Las personas de grupo 0 carecen de ambas enzimas; las de grupo A han heredado el gen que sintetiza la enzima que transfiere N-acetil-galactosamina; las de grupo B, la de galactosa y los AB poseen las dos. Por otra parte, cada individuo produce anticuerpos para el o los antígenos que no sintetiza.

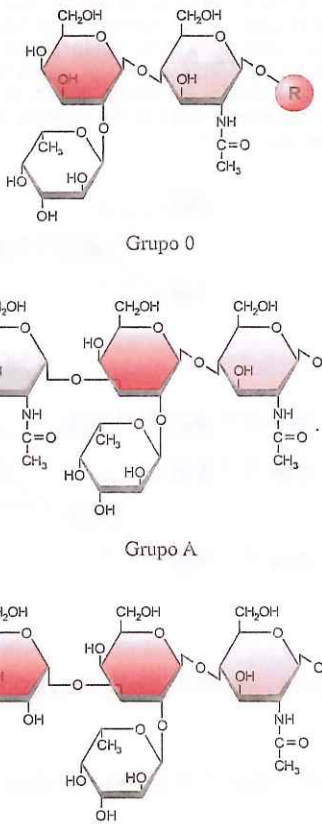


Fig. 4-24. Composición de los oligosacáridos de grupos sanguíneos del sistema AB0. Rosado: N-acetil-glucosamina; rojo: galactosa; gris: N-acetil-galactosamina; blanco: fucosa.

Así, los de grupo 0 tienen anticuerpos contra A y B; los A y B contra B y A respectivamente y los de grupo AB no producen anticuerpos A ni B. En las transfusiones, el donante y el receptor deben ser cuidadosamente tipificados, pues la administración de sangre de tipo incompatible provoca reacciones muy severas.

Glicoproteínas como moléculas señalizadoras. La complejidad y diversidad de los carbohidratos en las glicoproteínas los convierte en estructuras moleculares aptas para contener información. Los oligosacáridos en superficies de células y moléculas representan a menudo verdaderos

"marcadores" o "señales", que sirven para su reconocimiento. Los ejemplos siguientes dan idea de su papel en interacciones celulares y moleculares.

Una glicoproteína de la zona pelúcida del óvulo (ZP3) contiene oligosacáridos reconocidos por receptores en la superficie del espermatozoide; esto permite la interacción de las gametas femenina y masculina previa a la fecundación.

La adhesión de bacterias, virus y toxinas a la superficie de las células es la etapa previa a su penetración. Esta adhesión requiere la presencia de determinados componentes glucídicos, no sólo en glicoproteínas, sino también en glicolípidos de membrana plasmática. Por ejemplo, las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella tiphimurium* se unen a restos manosa. Una observación de interés en relación con este fenómeno es la pérdida de capacidad invasora de bacterias, virus o toxinas cuando se las incuba previamente con una solución del glúcido que reconocen selectivamente. El compuesto bloquea el sitio receptor en el microorganismo o toxina y los torna inocuos.

En células tumorales malignas se han observado cambios en oligosacáridos de superficie. Algunos autores proponen a esos cambios como determinantes de la conducta anómala de células neoplásicas. La alteración de las señales que condicionan las "relaciones sociales" entre células contribuiría al descontrol de los procesos de multiplicación y crecimiento.

Estas referencias aisladas dan idea de la importancia de este tipo de moléculas. Los avances en este campo han abierto nuevas perspectivas en la interpretación de muchos fenómenos biológicos y brindan oportunidades de aplicación en la práctica clínica.

RESUMEN

Los hidratos de carbono, carbohidratos o glúcidos son polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas, o bien polímeros que por hidrólisis generan este tipo de compuestos. Se clasifican en: a) *monosacáridos* o azúcares simples; b) *oligosacáridos*, sustancias formadas por 2 a 10 monosacáridos, y c) *polisacáridos*, macromoléculas constituidas por unión de gran número de monosacáridos.

Monosacáridos (MS). Se denominan aldosas o cetosas, según presenten función aldehído o cetona. De acuerdo con el número de C en su molécula se las llama triosas, tetrosas, pentosas, etc. Son reductores en medio alcalino. La aldotriosa más simple es gliceraldehído, con un C asimétrico o quiral y, por lo tanto, ópticamente activo. El isómero dextrorrotatorio es designado d y el levorrotatorio, l. En los MS, cuando aumenta el número de C en la molécula, también lo hace el de C quirales. El número de isómeros ópticos posibles para un MS dado se calcula con la fórmula 2^n, donde n = número de C quirales. Todos los MS cuya configuración en el C del alcohol secundario más distal de la función aldehído o cetona es igual a la del C2 del D-gliceraldehído, pertenecen a la serie D, independientemente del signo de su actividad óptica. El organismo humano utiliza y sintetiza casi exclusivamente glúcidos de la serie D. El MS más importante en bioquímica humana es la *glucosa*, utilizada como combustible por las células. Es aldohexosa; su molécula se cicliza por unión hemiacetálica de C1 con C5; resulta un ciclo hexagonal considerado derivado de pirano. A veces, el hemiacetal se forma entre C1 y C4; da un ciclo pentagonal derivado de furano. En su conformación cíclica, la glucosa presenta dos isómeros ópticos, α y β, que difieren en su índice de rotación específica (+112,2° el α y +18,7° el β). En solución, ambas formas se interconvierten (*mutarrotación*), hasta alcanzar el equilibrio cuando dos tercios de moléculas están en forma β y un tercio en α; esta mezcla tiene rotación específica +52,7°. *Galactosa*, una aldohexosa, se encuentra formando moléculas más complejas. Difiere de la glucosa en la configuración del C4. Reductora, presenta formas α y β. *Manosa*, aldohexosa, integra moléculas complejas. Difiere de la glucosa en la configuración de C2, reductora, presenta formas α y β. *Fructosa*, cetohexosa, D-fructosa es levorrotatoria (–92,4°), reductora, presenta formas α y β. La aldopentosa más importante es *ribosa*, componente de ARN. *Fórmulas de Haworth*. Representan anillos pirano y furano como un plano y los elementos unidos a los C del ciclo dispuestos a uno u otro lado del plano. Representaciones más realistas son las llamadas "silla" y "bote"; la primera es la más estable. *Derivados de MS: Glicósidos*. Resultan de unión del C hemiacetálico de MS con otro compuesto; cuando este compuesto no es un glúcido, se lo llama *aglicona*. No son reductores ni presentan mutarrotación. Los derivados de glucosa se llaman *glucósidos*. *Polialcoholes*. Se obtienen por reducción del aldehído o de la cetona; el derivado de glucosa es *sorbitol*. *Desoxiazúcares*. *Desoxirribosa*, forma parte de ADN. *Fucosa*, integra cadenas de oligosacáridos. *Productos de oxidación*. Por oxidación suave de aldosas, el aldehído (C1) se oxida a carboxilo y se originan *ácidos aldónicos*; el derivado de glucosa es el *ácido glucónico*. Oxidación más enérgica afecta C1 y C6, produce diácidos llamados *sacáricos*; el derivado de glucosa es *ácido glucárico*. Oxidación controlada protegiendo el C1 afecta sólo C6, da *ácidos urónicos*; el derivado de glucosa es *ácido glucurónico*. *Ésteres con fosfato*, intermediarios en vías metabólicas de MS. *Aminoazúcares*. Los más comunes tienen función amina unida a C2; ej. *glucosamina* y *galactosamina*. *Ácido neuramínico*, compuesto de 9 C, integrado por manosamina y ácido pirúvico; con restos acilos forma *ácidos siálicos*. *Ácido acetilmurámico*, formado por N-acetil-D-glucosamina unida a ácido láctico.

Disacáridos. *Maltosa*. Producto de hidrólisis de almidón por amilasa. Formada por dos D-glucosas unidas mediante enlace glucosídico α-1 ⟶ 4. Presenta formas α y β; reductora. *Lactosa*. Azúcar de leche; formada por

D-galactosa y D-glucosa en unión glicosídica β-1 → 4. Presenta formas α y β; reductora. *Sacarosa*. Utilizado como edulcorante. Constituida por D-fructosa y α-D-glucosa en enlace β-2 → 1; no reductora.

Polisacáridos o glicanos. Macromoléculas poliméricas. Se clasifican en homopolisacáridos y heteropolisacáridos según sean polímeros de una misma unidad o de dos o más unidades distintas.

Homopolisacáridos. Los formados por glucosas se llaman glucanos. *Almidón*. Sustancia de reserva nutricia en vegetales. Compuesto por *amilosa* (±20%) y *amilopectina* (±80%). *Amilosa*, constituida por 1.000 a 5.000 unidades de D-glucosa unidas linealmente por enlaces glucosídicos α-1 → 4. La cadena se dispone en hélice; con yodo da color azul. *Amilopectina*, polímero de más de 600.000 unidades glucosa. Estructura básica de amilosa y además ramificaciones, constituidas por cadenas de unos 25 restos glucosa (también en unión α-1 → 4) insertadas en la cadena principal por enlaces α-1 → 6; con yodo da color violeta. *Glucógeno*. Polímero de reserva en animales. Estructura similar a amilopectina, pero más ramificada; con yodo da color rojo caoba. *Dextrinas*. Productos de hidrólisis parcial de amilopectina por ácidos o enzimas. *Dextranos*. Polímeros ramificados de D-glucosas. Las cadenas principales formadas por glucosas en unión α-1 → 6. Las ramificaciones se desprenden por uniones α-1 → 2, α-1 → 3 o α-1 → 4. *Inulina*. Polímero de fructosas con enlaces α-2 → 1. *Celulosa*: Abundante en vegetales, desempeña importante papel estructural. Polímero lineal de glucosas con uniones β-1 → 4. *Quitina*. Forma el exoesqueleto de insectos y crustáceos. Unidades de N-acetil-D-glucosamina unidas por enlaces β-1 → 4.

Heteropolisacáridos. Glicosaminoglicanos, proteoglicanos, peptidoglicanos y los integrantes de glicoproteínas. *Glicosaminoglicanos*. *Ácido hialurónico*: su unidad estructural es el disacárido ácido D-glucurónico β-1 → 3-N-acetil-D-glucosamina. Cada unidad se une a la siguiente por enlace β-1 → 4. Su masa es de 100 a miles de kDa. *Condroitinsulfato*: la unidad es un disacárido ácido D-glucurónico-β-1 → 3-N-acetil-D-galactosamina. El C4 o el C6 de galactosamina esterificado con sulfato. *Dermatansulfato*: la unidad estructural es ácido L-idurónico-α-1 → 3-N-acetil-D-galactosamina. Sulfatos en C4 de galactosamina o C2 de ácido idurónico. *Queratansulfato*: no posee ácido urónico. Unidad formada por galactosa y N-acetil-D-glucosamina, esterificada con sulfato. *Heparina*: unidad disacarídica formada por D-glucosamina y ácido urónico, idurónico o glucurónico. Abundantes sulfatos le confieren carácter fuertemente ácido. Su masa es de 8 a 20 kDa. Anticoagulante, también produce aclaramiento de quilomicrones del plasma.

Proteoglicanos. Formados por cadenas de glicanos (condroitinsulfato, dermatansulfato, queratansulfato) unidas a proteínas por enlace glicosídico al hidroxilo de restos serina o treonina (enlace O-glicosídico), o a N de restos asparragina (enlace N-glicosídico). Más de 100 cadenas de glicosaminoglicanos se unen a una cadena polipeptídica. Esta a su vez se inserta, mediante una proteína de enlace, en la cadena central de ácido hialurónico. Se forman enormes complejos moleculares dispuestos en reticulado tridimensional en el espacio extracelular de tejidos conjuntivos.

Peptidoglicanos. Forman la pared de bacterias. Constituidas por polisacáridos de N-acetil-D-glucosamina y ácido-N-acetil-murámico unidos entre sí por "puentes" transversales de oligopéptidos.

Glicoproteínas. Proteínas conjugadas con hidratos de carbono mediante uniones O- o N- glicosídicas. Se diferencian de proteoglicanos por sus cadenas glucídicas más cortas (oligosacáridos), dan por hidrólisis más de dos MS diferentes. La unión O-glicosídica del oligosacárido se hace a hidroxilos de restos serina o treonina de la proteína. Las cadenas en unión N-glicosídica se distinguen en: a) de alto contenido de manosas, b) complejas y c) híbridas. Las glicoproteínas desempeñan funciones importantes. En la superficie de células y moléculas, los oligosacáridos representan verdaderos marcadores o señalizadores.

BIBLIOGRAFÍA

Casu B., Lindahl U. (2001). Structure and biological interactions of heparin and heparin sulfate. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 57: 159-206.

Elgavish S., Shaanan B. (1997). Lectin-carbohydrate interactions: Different folds, common recognition principles. *Trends in Biochemical Sciences*, 22: 462-467.

Greenberg R.E. (Ed.). (1995). New dimensions in carbohydrates. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61, Supl.: 915S-1011S.

Freeze H.H., Aebi M. (2005). Altered glycan structures: The molecular basis of congenital disorders of glycosylation. *Current Opinion of Structrural Biology*, 15: 490-498.

Lindhorst T.K. (2003). *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. 6ta. Ed., Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J.

Sharon N., Lis H. (1995). Lectins –proteins with a sweet tooh: function in cell recognition. *Essays in Biochemistry*, 30: 59-75.

Taylor M.E.., Drickamer K. (2006). *Introduction to Glycobiology*, 2da. Ed., Oxford University Press, Nueva York.

Varki A., Cummings R., Esko J. Freeze H., Hart G., Marth J. (2002). *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

CAPÍTULO 5

Lípidos

Los lípidos, ampliamente distribuidos en animales y vegetales, comprenden un grupo heterogéneo de sustancias que poseen como característica común el ser poco o nada solubles en agua y solubles en solventes orgánicos. Esta propiedad se explica por la escasa polaridad de sus moléculas. (Debido a las interacciones moleculares, una sustancia determinada es soluble en solventes de naturaleza semejante a la suya. Sustancias polares se disuelven en solventes polares; sustancias no polares, en solventes no polares).

Los lípidos no forman estructuras poliméricas macromoleculares como las de polipéptidos o polisacáridos; su masa no alcanza valores muy elevados.

El estudio de lípidos tiene especial interés desde el punto de vista biológico: a) Son componentes esenciales de los seres vivos; constituyen parte fundamental de las membranas celulares. b) En animales forman el principal material de reserva energética (grasas neutras). c) Desde el punto de vista nutritivo, los lípidos de alimentos son importantes fuentes de energía por su alto contenido calórico, vehiculizan vitaminas liposolubles y aportan compuestos indispensables (ácidos grasos esenciales) que el organismo no puede sintetizar. d) Numerosas sustancias de notable actividad fisiológica están relacionadas con este grupo de compuestos: hormonas, algunas vitaminas, ácidos biliares.

Clasificación

De acuerdo con la complejidad de su molécula se distinguen dos categorías de lípidos, *simples* y *complejos*. Existen además otras sustancias que comparten las propiedades de solubilidad de los lípidos y se asocian a ellos en la naturaleza.

Son lípidos simples los *acilgliceroles* y las *ceras*. Los lípidos complejos comprenden *fosfolípidos*, *glicolípidos* y *lipoproteínas*. Entre las sustancias asociadas a lípidos se consideran diversos compuestos, como *esteroles*, *terpenos*, *vitaminas liposolubles*.

En la molécula de casi todos los lípidos se encuentran ácidos orgánicos monocarboxílicos denominados genéricamente *ácidos grasos*. La importancia de estos compuestos en la constitución de lípidos y en la determinación de sus propiedades aconsejan su estudio en primer término.

ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos aislados de lípidos animales son monocarboxílicos, de cadena lineal. Es muy pequeña la cantidad de estos compuestos al estado libre; casi todos están combinados, formando lípidos simples o complejos. En la naturaleza se hallan ácidos grasos cíclicos en lípidos de algunos microorganismos y semillas. En las ceras se han encontrado ácidos grasos de cadena ramificada.

Los ácidos grasos de origen animal poseen, en general, número par de átomos de carbono (de 4 a 26 carbonos); pueden ser saturados, de fórmula general $CH_3–(CH_2)_n–COOH$, o insaturados, es decir, con dobles ligaduras entre carbonos de la cadena. Los ácidos grasos insaturados pueden presentar una doble ligadura (monoinsaturados o monoetilénicos) o más (poliinsaturados o polietilénicos). Cuando existe más de un doble enlace, generalmente no son conjugados:

$$-CH=CH-CH=CH-$$

sino separados por un puente metileno ($-CH_2-$):

$$-CH=CH-CH_2-CH=CH-$$

Se han aislado ácidos grasos con número impar de átomos de carbono, pero en cantidad muy inferior a los de número par. Como veremos más adelante, los ácidos grasos se sintetizan o degradan en organismos animales por adición o separación, respectivamente, de unidades de dos carbonos; esto explica el predominio de ácidos grasos con número par de carbonos.

En lípidos de animales, los ácidos grasos más abundantes son los de 16 o 18 átomos de carbono. Se suelen encontrar, como componentes de lípidos naturales, ácidos grasos hidroxilados (generalmente en carbono 2); su incidencia es muy reducida. La tabla 5-1 presenta una lista de los principales ácidos grasos.

El nombre sistemático de ácidos grasos se forma agregando el sufijo *oico* al del hidrocarburo del cual derivan, pero es más frecuente el uso del nombre común o trivial (tabla 5-1). Los carbonos de la cadena de un ácido graso se numeran a partir del C con la función carboxilo, al cual se le asigna el número 1. También se utilizan letras griegas; se llama α el carbono adyacente al carboxilo (C2) y β, γ, etc., los siguientes. Se designa ω (omega) al último carbono, cualquiera sea su número de orden. Para representar cada ácido graso se utiliza la siguiente notación simplificada: número de carbonos, seguido de dos puntos y otro número que indica cantidad de dobles enlaces existentes en la cadena. Por ej., ácido esteárico es 18:0; linoléni-

Tabla 5-1. Ácidos grasos comunes en la naturaleza.

Nombre común	Nº de C	Nombre sistemático	Temperatura de fusión (°C)	Fórmula
Ácidos grasos saturados				
Butírico	4	Butanoico	-7,9	$CH_3-(CH_2)_2-COOH$
Caproico	6	Hexanoico	-3,4	$CH_3-(CH_2)_4-COOH$
Caprílico	8	Octanoico	16,3	$CH_3-(CH_2)_6-COOH$
Cáprico	10	Decanoico	31,2	$CH_3-(CH_2)_8-COOH$
Láurico	12	Dodecanoico	43,9	$CH_3-(CH_2)_{10}-COOH$
Mirístico	14	Tetradecanoico	54,1	$CH_3-(CH_2)_{12}-COOH$
Palmítico	16	Hexadecanoico	62,7	$CH_3-(CH_2)_{14}-COOH$
Esteárico	18	Octadecanoico	69,9	$CH_3-(CH_2)_{16}-COOH$
Araquídico	20	Eicosanoico	75,4	$CH_3-(CH_2)_{18}-COOH$
Behénico	22	Docosanoico	80,0	$CH_3-(CH_2)_{20}-COOH$
Lignocérico	24	Tetracosanoico	84,2	$CH_3-(CH_2)_{22}-COOH$
Hidroxiácido saturado				
Cerebrónico	24	2-Hidroxitetracosanoico	-100,0	$CH_3-(CH_2)_{21}-CHOH-COOH$
Ácidos grasos insaturados				
		Monoetilénicos		
Palmitoleico	16	cis Δ9-Hexadecenoico ω7	0,5	$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_7COOH$
Oleico	18	cis Δ9-Octadecenoico ω9	13,4	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$
Erúcico	22	cis Δ13-Docosenoico ω9		$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_{11}COOH$
Nervónico	24	cis Δ15-Tetracosenoico ω9		$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_{13}COOH$
		Dietilénico		
Linoleico	18	cis Δ9,12 Octadecadienoico ω6	-5,0	$CH_3(CH_2)_4CH=CH-CH_2-CH=CH(CH_2)_7COOH$
		Polietilénicos		
Linolénico	18	cis Δ9,12,15 Octadecatrienoico ω3	-10,0	
Araquidónico	20	cis Δ5,8,11,14 Eicosatetraenoico ω6	-49,5	
Timnodónico	20	cis Δ5,8,11,14,17 Eicosapentaenoico ω3		
Clupanodónico	22	cis Δ7,10,13,16,19 Docosapentaenoico ω3		
Cervónico	22	cis Δ4,7,10,13,16,19 Docosahexaenoico ω3		

co, 18:3. En ácidos grasos insaturados, además del número de dobles ligaduras, debe indicarse su posición. Para ello se coloca, a continuación de la notación anterior, entre paréntesis, el o los números de los carbonos en los cuales comienza una doble ligadura. Por ej., ácido oleico es 18:1 (9) (el doble enlace se encuentra entre C9 y 10); ácido araquidónico es 20:4 (5,8,11,14). También se utiliza el símbolo Δ (delta mayúscula) seguido del número de los carbonos en los cuales se inicia un doble enlace. Así, ácido linolénico se indica 18:3 Δ9,12,15.

Existe otra notación para indicar la posición de dobles enlaces, contando a partir del carbono ω. En este caso, el ácido oleico será 18:1 ω9 (o n9); el linoleico, 18:2 ω6 (o n6); el linolénico, 18:3 ω3 (o n3); el araquidónico, 20:4 ω6 (o n6). Como las dobles ligaduras están separadas por puentes metileno ($-CH_2-$), conociendo el número de ellas y la posición de la más próxima al Cω, se puede deducir la posición de las otras. La notación ω es útil cuando se considera la biosíntesis de ácidos polietilénicos.

Propiedades de ácidos grasos

Propiedades físicas

Solubilidad. Los ácidos grasos están constituidos por un grupo polar (hidrófilo), representado por la función carboxilo, y un grupo no polar (hidrófobo), constituido por la cadena carbonada.

La solubilidad de los ácidos grasos disminuye a medida que la longitud de la cadena crece. Aquellos de más de seis carbonos son prácticamente insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos, pues prevalece la larga cadena hidrófoba sobre el grupo carboxilo, hidrófilo.

Temperatura de fusión y ebullición. La temperatura de fusión aumenta con el largo de cadena (tabla 5-1). Ácidos grasos saturados de dos a ocho carbonos son líquidos (considerados a 20°C), mientras los de mayor número de carbonos son sólidos.

La presencia de un doble enlace disminuye la temperatura de fusión, que desciende aún más al aumentar el número de dobles ligaduras en la cadena. El temperatura de fusión de ácido esteárico es 69,9°C; por lo tanto, es sólido a 20°C. Si se introduce una doble ligadura entre carbonos 9 y 10, el ácido esteárico se transforma en oleico y la temperatura de fusión desciende a 13,4°C. El ácido oleico es líquido a 20°C. Adición de una segunda doble ligadura entre carbonos 12 y 13 de ácido oleico genera linoleico, cuya temperatura de fusión es -5°C.

La temperatura de ebullición de ácidos grasos también depende del número de carbonos de su cadena. Aumenta con la longitud de ésta.

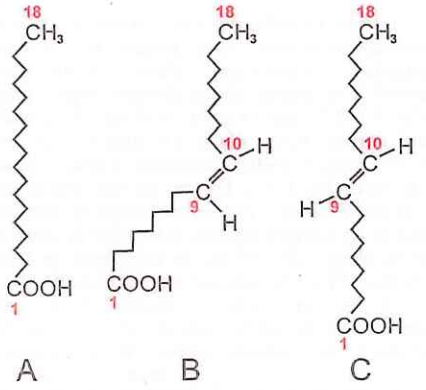
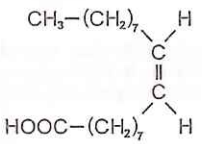


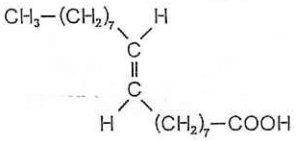
Fig. 5-1. Disposición de la cadena de carbonos de ácidos grasos. A. Ácido graso saturado (esteárico) B. Ácido graso monoetilénico configuración cis (oleico). C. Ácido graso monoetilénico configuración trans (elaídico).

Isomería geométrica. Los ácidos grasos saturados adoptan diferentes disposiciones espaciales, pues los enlaces simples entre carbonos permiten libre rotación. Sin embargo, la presencia de los hidrógenos unidos a los átomos de carbono de la cadena hace más estable (de menor energía libre) la conformación lineal extendida, formando un zigzag, con ángulos de 109° entre dos enlaces sucesivos (fig. 5-1).

Los ácidos grasos insaturados o etilénicos poseen una estructura más rígida, porque el doble enlace fija los dos carbonos y no les permite rotar. La existencia de doble enlace crea la posibilidad de isomería geométrica. De acuerdo con la posición de sustituyentes según el plano determinado por la doble ligadura, se tienen isómeros *cis-trans*:



Ácido oleico
(cis)



Ácido elaídico
(trans)

La casi totalidad de ácidos grasos insaturados naturales se presenta como isómeros *cis*. La configuración *cis* produce una acodadura en cada enlace etilénico; la cadena adopta diversas disposiciones (fig. 5-1, 5-2); por ejemplo, en U (fig. 5-3), o aún más cerrada sobre sí misma. La forma *trans* presenta estructura extendida, semejante a la de cadenas saturadas (fig. 5-1C). Formas *cis* son más inestables que las *trans*, y pueden convertirse en éstas por acción de diversos agentes, entre ellos el calor. El ácido oleico (18:1 Δ9 cis) se transforma en ácido elaídico (18:1 Δ9 trans), con propiedades diferentes.

Si bien los productos naturales tienen gran predominio de ácidos grasos *cis*, se encuentra siempre una pequeña proporción de isómeros *trans*. Por ejemplo, la grasa de la leche contiene de 4 a 8% de ese tipo de ácidos grasos. En cambio, en grasas sometidas a hidrogenación, como en la elaboración de margarinas, se alcanzan cantidades significativamente mayores.

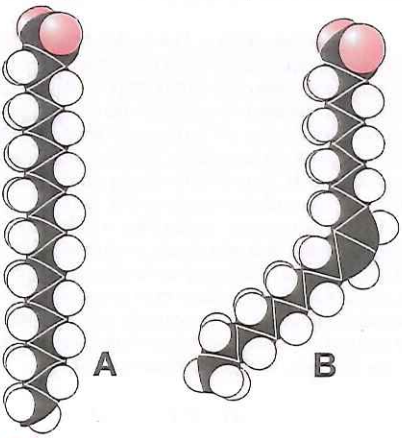


Fig. 5-2. Modelos moleculares espaciales compactos. A. Ácido graso saturado. B. Ácido graso monoetilénico (oleico). Carbono: negro; oxígeno: rojo; Hidrógeno: blanco.

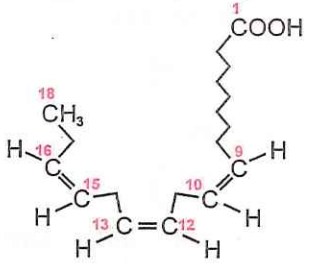


Fig. 5-3. Disposición de la cadena de carbonos de un ácido graso trietilénico, configuración cis (linolénico).

Propiedades químicas

Se considerarán propiedades derivadas de la presencia del grupo carboxilo y las relacionadas con la cadena hidrocarbonada.

Propiedades dependientes del grupo carboxilo

Carácter ácido. El grupo carboxilo es responsable del carácter ácido. El ácido acético, muy soluble en agua, se ioniza del siguiente modo:

$$CH_3COOH \longrightarrow CH_3COO^- + H^+$$

Al aumentar el número de carbonos en la cadena se reduce la solubilidad y disminuye el carácter acídico.

Formación de sales (jabones). Cuando un ácido graso reacciona con una base se forma una sal:

$$CH_3(CH_2)_{12}COOH + Na\,OH \longrightarrow$$

Acido mirístico

$$\longrightarrow CH_3(CH_2)_{12}COONa + H_2O$$

Miristato de sodio

Las sales se designan agregando al nombre del ácido graso el sufijo "*ato*" y el metal correspondiente (ej. estearato de potasio). Estas sales de ácidos grasos se llaman *jabones*. Los de metales alcalinos (Na, K, etc.) son solubles en agua y actúan como emulsionantes o detergentes.

Las sales formadas con elementos del Grupo II de la Tabla Periódica (Ca, Mg, Ba) o algún otro metal pesado, son insolubles en agua y muy poco en solventes orgánicos. Por ello las aguas "duras" (ricas en Ca^{2+} o Mg^{2+}) "cortan" el jabón; las sales de calcio o de magnesio precipitan y no forman espuma sino grumos.

Acción emulsionante de jabones solubles. (Se denomina emulsión a la mezcla heterogénea de dos líquidos no solubles entre sí, uno de los cuales se encuentra disperso en pequeñas gotitas en el seno del otro).

En un recipiente con aceite y agua, ambos líquidos se mantienen separados; el aceite, menos denso, se dispone en una capa encima del agua. Por agitación, el aceite se divide en pequeñas gotitas que forman una emulsión inestable; al cabo de corto tiempo, esas gotitas se reúnen y reconstituyen las dos capas iniciales

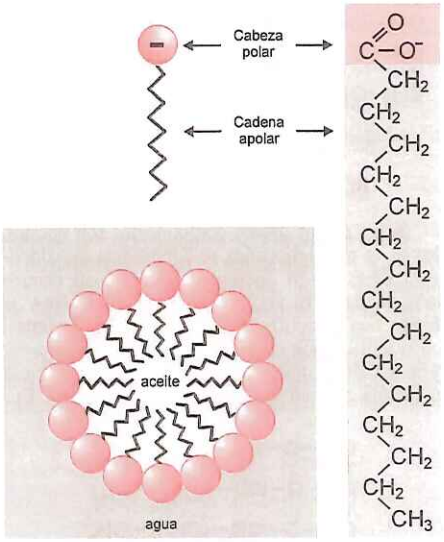


Fig. 5-4. Efecto emulsionante de jabones solubles.

aceite/agua. Si antes de agitar se agrega un jabón soluble, por ejemplo palmitato de sodio, se logra una emulsión estable, es decir, el aceite se mantiene disperso en finas gotitas en el seno del agua. Las moléculas de jabón poseen la cadena carbonada (CH_3–$(CH_2)_{14}$–) francamente apolar (soluble en aceite e insoluble en agua), hidrófoba, y el grupo –COONa, ionizado en $-COO^-$ y Na^+, netamente polar, hidrófilo (soluble en agua e insoluble en aceite). Los iones de jabón se orientan en la superficie de separación entre gotitas de aceite y agua, con el grupo alquílico dirigido hacia el aceite y los iones carboxilato hacia el agua (fig. 5-4). Las gotitas, todas con carga negativa, se repelen mutuamente, lo cual ayuda a mantenerlas en emulsión. La superficie de las gotitas, cubierta por los grupos $-COO^-$, atrae moléculas de agua, importante factor que estabiliza la emulsión.

Formación de ésteres. Los ácidos grasos, por reacción con alcoholes, forman ésteres. Ej.:

$$\underset{\text{Ácido esteárico}}{CH_3(CH_2)_{16}COOH} + \underset{\text{Etanol}}{CH_3CH_2OH} \xrightarrow{-H_2O} \underset{\text{Estearato de etilo}}{CH_3(CH_2)_{16}COOCH_2CH_3}$$

Propiedades dependientes de la cadena carbonada

Oxidación. Los ácidos grasos no saturados se oxidan más fácilmente. Por ejemplo, el oxígeno atmosférico puede oxidar ácido oleico a la altura del doble enlace, formando *peróxidos*. Este peróxido es susceptible de seguir oxidándose y producir ruptura de la cadena carbonada del ácido graso en el sitio donde se encontraba la doble ligadura. Se generan diferentes compuestos (ácidos dicarboxílicos y monocarboxílicos de cadena corta, aldehídos, etc.), responsables del olor y sabor rancio típicos de las grasas oxidadas.

$$\underset{\text{Ácido oleico}}{CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH} \xrightarrow{O_2} \underset{\text{Peróxido}}{CH_3(CH_2)_7CH(-O-O-)CH(CH_2)_7COOH}$$

Hidrogenación. En la naturaleza son más abundantes los ácidos grasos no saturados. En la industria son, en general, más útiles los ácidos grasos saturados. Para obtener éstos a partir de los primeros, se procede a la hidrogenación en presencia de catalizadores (Pt, Ni, Pd, etc.). Los hidrógenos se adicionan a los carbonos del doble enlace y éste desaparece.

$$\underset{\text{Ácido oleico líquido a 20°C}}{CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH} \xrightarrow[+H_2]{Ni} \underset{\text{Ácido esteárico sólido a 20°C}}{CH_3(CH_2)_{16}COOH}$$

Halogenación. Los dobles enlaces adicionan fácilmente halógenos (F, Cl, Br, I).

$$-CH_2CH=CHCH_2- \xrightarrow{+I_2} -CH_2\underset{I}{CH}\,\underset{I}{CH}CH_2-$$

Esta propiedad se utiliza para conocer el grado de insaturación de los ácidos grasos constituyentes de un material biológico; generalmente se emplea yodo. En condiciones controladas, la masa de halógeno consumida por una cantidad determinada de sustancia, es proporcional al número de dobles ligaduras existentes. Se define como *número de*

yodo la cantidad, en gramos, necesaria para halogenar 100 g de un material lipídico.

Ácidos grasos esenciales o indispensables

Como veremos más adelante, los animales producen ácidos grasos a partir de trozos de dos carbonos. Sin embargo, existen algunos ácidos grasos, funcionalmente importantes, que no pueden ser sintetizados por el organismo y deben ser provistos con la dieta; son llamados *esenciales o indispensables*.

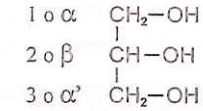
Ácidos grasos esenciales son *linoleico*, *linolénico* y *araquidónico*, todos ellos polietilénicos o poliinsaturados, es decir, con más de un doble enlace.

LÍPIDOS SIMPLES

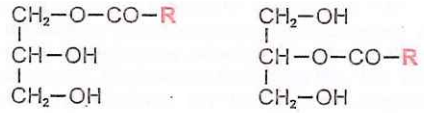
Acilgliceroles

La mayor parte de ácidos grasos presentes en el organismo forma ésteres con diferentes alcoholes, preferentemente glicerol o glicerina, generando compuestos llamados *acilgliceroles* o *acilglicéridos*.

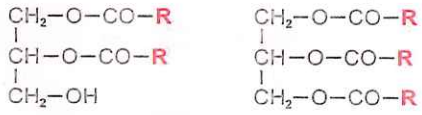
El glicerol tiene tres funciones alcohólicas, una en cada uno de sus carbonos. Los carbonos del glicerol se designan con números arábigos o también con letras del alfabeto griego. Los carbonos primarios 1 y 3 son también denominados α y el carbono 2, β.



Según el número de funciones alcohólicas esterificadas por ácidos grasos se obtienen *monoacilgliceroles*, *diacilgliceroles* o *triacilgliceroles*. Los nombres mono-, di- y triglicéridos, muy utilizados, no son aconsejables y deben ser abandonados. Los triacilgliceroles son comúnmente llamados *grasas neutras*.



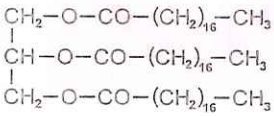
1-monoacil glicerol 2-monoacil glicerol



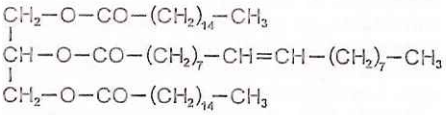
1,2-diacil glicerol Triacil glicerol

R: cadena carbonada de ácidos grasos.

Si los ácidos grasos componentes son iguales, los di- y triacilgliceroles se denominan *homoacilgliceroles*; si son diferentes, se designan *heteroacilgliceroles*. El nombre de estos compuestos se forma con el de los ácidos grasos constituyentes, cuya terminación es reemplazada por el sufijo *oil*, y se numeran según el orden de su ubicación en la molécula. Al final se agrega la palabra glicerol. Ej.:



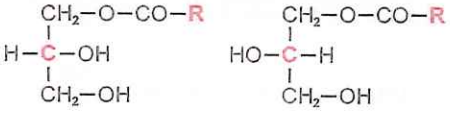
Triestearoilglicerol o triestearina
(homotriacilglicerol)



1,3-dipalmitoil-2-oleil-glicerol
(heterotriacilglicerol)

Para homotriacilgliceroles se usan también nombres triviales, como tripalmitina, triestearina, trioleína, etc.

En el 1-monoacilglicerol, el carbono 2 del glicerol es asimétrico o quiral; el compuesto tiene dos estereoisómeros, D y L. De acuerdo con la convención adoptada para gliceraldehído (pág. 25), la forma D se representa con el hidroxilo del carbono 2 hacia la derecha y la forma L, con dicho hidroxilo hacia la izquierda.

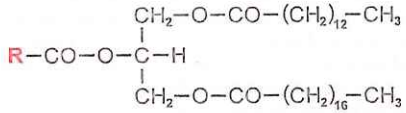


D-monoacilglicerol L-monoacilglicerol

(C en rojo es asimétrico)

En 1,2-diacilgliceroles y di- y triacilgliceroles en cuyos carbonos 1 y 3 existen restos acilos diferentes, el carbono 2 es asimétrico. Todos los compuestos naturales de este tipo pertenecen a la serie L.

Para evitar problemas creados por la numeración de los carbonos, pues se llama indistintamente 1 o 3 a cualquiera de los carbonos primarios de glicerol, se ha adoptado una notación llamada *estereoespecífica* (*sn*, del inglés *stereospecific numbering*). El glicerol se representa con el hidroxilo de C2 hacia la izquierda y se asigna el número 1 al carbono que queda arriba.



R: $CH_3-(CH_2)_4-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_7-$

Nombre sistemático:
1-miristoil-2-linoleil-3-estearoil-*sn*-glicerol
o 1-miristoil-2-linoleil-3-estearoil-L-glicerol

Propiedades de acilgliceroles

Propiedades físicas

Solubilidad. Poseen densidad inferior a la del agua, solvente en el cual los triacilgliceroles son prácticamente insolubles. Los mono y diacilgliceroles, moléculas polares gracias a sus grupos hidroxilos libres, tienen poder emulsionante. Los triacilgliceroles son solubles en cloroformo, éter, alcohol caliente, etc., solventes con los cuales se los extrae de los tejidos.

Temperatura de fusión. La temperatura de fusión de acilgliceroles depende de los ácidos grasos componentes. Los que poseen ácidos grasos saturados de cadena larga funden a mayor temperatura; en cambio, cuando los ácidos grasos son saturados de cadena corta o no saturados, la temperatura de fusión disminuye. Por ejemplo, la triestearina tiene temperatura de fusión 71°C, mientras que la trioleína funde a –17°C.

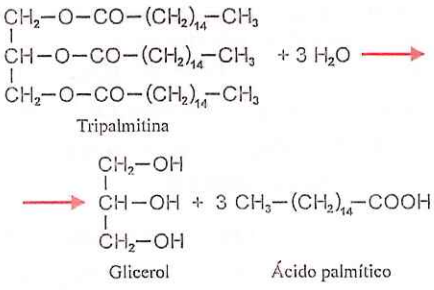
Heteroacilgliceroles con ácidos grasos insaturados son líquidos a temperatura ambiente, o sólidos de baja temperatura de fusión, según la proporción de ácidos grasos etilénicos existentes en su molécula. El predominio de ácidos grasos insaturados o saturados de cadena corta es responsable del estado líquido de una grasa natural a temperatura ambiente. Los aceites vegetales contienen triacilgliceroles ricos en ácidos grasos insaturados de cadena larga.

Isomerías. Además de las isomerías de posición posibles en heteroacilgliceroles, estos compuestos también presentan isomería óptica, ya mencionada.

Propiedades químicas

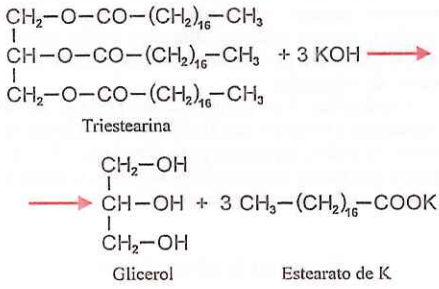
Dependen principalmente de las funciones éster y de las cadenas carbonadas de sus ácidos grasos.

Hidrólisis. Por calentamiento con agua en medio ácido, los acilgliceroles sufren hidrólisis, con separación de glicerol y ácidos grasos.



Tripalmitina — Glicerol — Ácido palmítico

Los acilglicéridos se escinden fácilmente cuando se calientan en presencia de bases fuertes (KOH, NaOH) dando glicerol y las sales correspondientes de ácidos grasos (jabones). Este proceso recibe el nombre de *saponificación*.

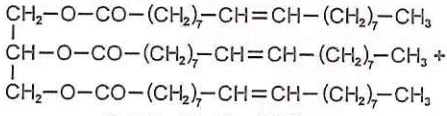


Triestearina — Glicerol — Estearato de K

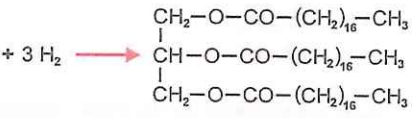
Junto a los triacilgliceroles, en las grasas suelen existir sustancias carentes de funciones éster, como hidrocarburos, esteroles libres, pigmentos, etc., que en conjunto forman la fracción *insaponificable*. Después de la saponificación, los compuestos con función éster (acilgliceroles) se convierten en glicerol y jabones, ambos solubles en

agua e insolubles en éter, a diferencia de la grasa original. El insaponificable sigue siendo soluble en éter e insoluble en agua, características que permiten su separación.

Hidrogenación. En la industria se obtienen grasas sólidas por hidrogenación de aceites en presencia de níquel como catalizador. Este proceso se usa para elaborar margarinas. La hidrogenación de ácidos grasos insaturados de acilgliceroles del aceite es sólo parcial, hasta obtener un sólido de consistencia similar a la de manteca de leche. Si la hidrogenación fuese total, se obtendrían grasas muy duras, lo cual dificultaría su empleo doméstico. El proceso de hidrogenación produce además isomerización de las cadenas *cis* de ácidos grasos insaturados remanentes; parte de ellos se convierte en isómeros *trans*.



Trioleína (líquida a 20° C)



Triestearina (sólida a 20° C)

La composición de margarinas es distinta de la de manteca, pues ésta debe su consistencia a sus acilgliceroles con ácidos grasos de cadena corta (butírico, caproico, etc.). Además, la manteca contiene vitaminas. Las margarinas, en cambio, poseen acilgliceroles con ácidos grasos de cadena larga parcialmente hidrogenados y carecen de vitaminas.

Oxidación. Los acilgliceroles pueden sufrir oxidación a nivel de sus ácidos grasos etilénicos, como se indicó anteriormente para éstos. Se originan productos responsables del olor y sabor a rancio (*enranciamiento* de grasas).

Grasas en la alimentación

Los lípidos poseen un valor calórico muy superior al de otros principios de la dieta. Un gramo de grasa provee 9,3 kcal (38,9 kJ), mientras la misma cantidad de glúcidos da 4,1 kcal (17,2 kJ).

Todos los animales poseen grasas neutras como reserva. Esta reserva es más importante que la de carbohidratos, pues éstos, en caso de ayuno, se agotan rápidamente. Los triacilgliceroles constituyen una forma eficiente y concentrada de almacenar energía. Como casi todos los carbonos constituyentes de las grasas están relativamente menos oxidados que los de hidratos de carbono, su oxidación hasta CO_2 y H_2O rinde más desde el punto de vista de producción de energía. Por otra parte, debido a su carácter hidrofóbico, las grasas prácticamente no retienen agua asociada, a diferencia del otro material de reserva, glucógeno, que tiene un buen grado de hidratación. En consecuencia, con grasas se puede almacenar mayor cantidad de energía en menos peso.

La composición química de grasas varía, aun en el mismo animal, según su localización. En general, grasas con funciones de sostén son semisólidas, con predominio de ácidos grasos saturados de cadena larga (por ej., grasa perirrenal). Las grasas de reserva, rápidamente utilizables para atender demandas energéticas del organismo, son casi líquidas a temperatura corporal. La composición de grasas de reserva, en cierta medida, es influida por la composición de grasas de la dieta.

En la grasa de depósito de especies animales, el ácido graso predominante es oleico. En aceites vegetales también el oleico es abundante, pero en algunos de estos aceites existe elevado porcentaje de ácidos grasos polietilénicos. Por ej., aceite de maíz tiene 41,8% de ácido linoleico. También son ricos en ácidos grasos poliinsaturados los aceites de uva, girasol y maní. El aceite de oliva es relativamente pobre en esos ácidos grasos esenciales. En grasas de varias especies de peces se encuentran ácidos grasos poliinsaturados de 20 y 22 carbonos.

Se ha observado que el consumo de dietas ricas en ácidos grasos polietilénicos de configuración *cis* contribuye a reducir la concentración de colesterol en sangre en personas con colesterolemia elevada y tendría valor como factor preventivo de aterosclerosis. En contraposición, grasas animales, con mayor proporción de ácidos grasos saturados, y alimentos con ácidos grasos insaturados *trans* favorecen el mantenimiento de niveles elevados de colesterol.

Numerosos estudios mostraron que el ácido linoleico (AL) (18:2Δ9,12) y los ω3 (o n3), linolénico (ALN) (18:3Δ9,12,15), eicosapentaenoico (AEP) (20:5Δ5,8,11,14,17) y docosahexaenoico (ADH) (22:6Δ4,7,10,13,16,19) protegen de la enfermedad coronaria. Estos ácidos, principalmente el AL, tienen un efecto regulador del metabolismo de lipoproteínas del plasma (ver pág. 311): disminuyen la producción de LDL y promueven su eliminación. Los ácidos grasos esenciales tienden a reducir los efectos hiperlipemiantes de otros componentes de la dieta, como ácidos grasos saturados, insaturados *trans* y colesterol. AEP y ADH ayudan a conservar el buen estado del endotelio vascular y a reducir la

presión arterial, la tendencia a la aglutinación de plaquetas y el nivel de triacilglicéridos en plasma. Se considera adecuada una dieta que posea una relación de ácidos grasos ω6:ω3 (n6:n3) de 6:1, pero la principal consideración debe ser la cantidad total de ácidos grasos esenciales (se recomienda que éstos provean entre 1 y 2% del total de calorías).

Ácido linoleico conjugado. Este nombre comprende un conjunto de ácidos grasos dienoicos, isómeros de posición y estereoisómeros del ácido linoleico u octadecadienoico (18:2Δcis9, cis12). Se encuentran en alimentos (carnes, leche y productos lácteos) de origen bovino y ovino. Los isómeros más abundantes en esos alimentos son el cis 9, trans 11, también llamado *ácido ruménico*, el trans 7, cis 9 y el cis 11, trans 13 (fig. 5-5).

La inclusión de estos ácidos en la dieta de animales de laboratorio (rata, ratón) mostró efectos beneficiosos: reducción de la proporción de grasa y peso corporal, disminución de la incidencia de tumores malignos, de aterosclerosis y diabetes. Si bien algunos estudios afirman obtener efectos similares en humanos, otros presentan resultados contradictorios. Por esta razón, hasta no obtener datos más convincentes, no se aconseja suministrar ácido linoleico conjugado en cantidades importantes (mayores del 0,5% del total de ácidos grasos) en la alimentación.

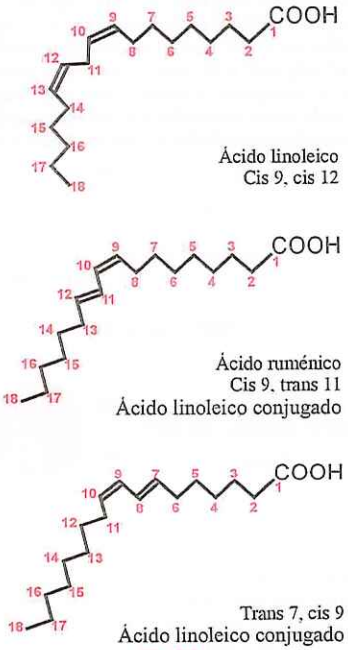


Fig. 5-5.

Ceras

Son ésteres de alcoholes monovalentes de cadena larga y ácidos grasos superiores. Por ej., en cera de abejas, uno de los componentes más importantes es el éster de un alcohol de 30 carbonos ($C_{30}H_{61}OH$) y ácido palmítico. Son sólidas a temperatura ambiente e insolubles en agua. Generalmente cumplen funciones de protección y lubricación. Contribuyen a lubricar la piel e impermeabilizar pelos y plumas; las abejas las utilizan para construir sus colmenas. En vegetales, se encuentran recubriendo hojas y frutos. Organismos que forman el plancton son ricos en ceras; por esta razón, animales marinos de regiones frías, cuyo alimento principal es plancton, acumulan ceras como principal reserva energética.

LÍPIDOS COMPLEJOS

Llevan ese nombre porque, además de alcohol y ácidos grasos, presentes en lípidos simples, poseen otros componentes.

Se los divide en *fosfolípidos* y *glicolípidos*, con ácido fosfórico y glúcidos respectivamente. También se incluye entre los lípidos complejos a las *lipoproteínas*.

Fosfolípidos

Estos lípidos complejos poseen ácido fosfórico en enlace éster. Hay tejidos muy ricos en fosfolípidos; en cerebro, por ejemplo, representan hasta 30% de su peso seco, mientras en otros, como tejido muscular, sólo 2%.

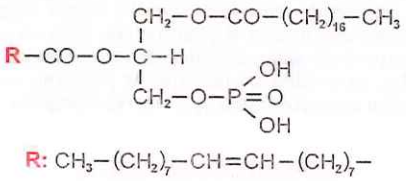
En la constitución de fosfolípidos participan alcohol, ácidos grasos y ácido fosfórico. Se los subdivide en *glicerofosfolípidos* (cuando el alcohol es glicerol) y *esfingofosfolípidos* (cuando es esfingosina).

Glicerofosfolípidos

Son los fosfolípidos más abundantes. Se encuentran predominantemente en membranas celulares; existen cantidades muy pequeñas en las grasas de depósito. Además de ser el soporte estructural de membranas celulares, son una fuente de compuestos fisiológicamente activos. Comúnmente poseen ara-

quidonato en la posición 2; este ácido graso puede ser liberado cuando se lo requiere para la síntesis de eicosanoides (pág. 312). Uno de los glicerofosfolípidos participa en sistemas de transmisión de señales en el interior celular y como dispositivo de anclaje de proteínas a membranas.

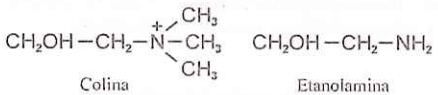
Derivan de *ácidos fosfatídicos*, compuestos formados por una molécula de glicerol, con dos de sus hidroxilos esterificados por ácidos grasos y el tercero, por ácido fosfórico. El carbono 2 del resto glicerol es asimétrico; por lo tanto, existen estereoisómeros. Los glicerofosfolípidos naturales poseen configuración L. La numeración de carbonos se hace de acuerdo con las reglas de *stereospecific numbering* (*sn*) ya mencionadas. El carbono cuyo –OH está esterificado con fosfato lleva número 3. Ej.:



Ácido fosfatídico
Nombre sistemático: 1-estearoil-2-oleil-*sn*-glicerol-3-fosfato

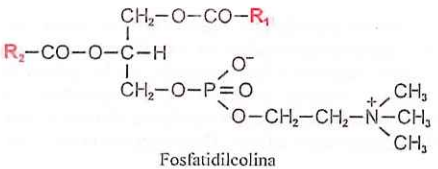
Se habla de ácidos fosfatídicos en plural, porque al cambiar los ácidos grasos se obtienen diferentes compuestos.

Los ácidos fosfatídicos se producen en el organismo como intermediarios en la síntesis de triacilgliceroles y glicerofosfolípidos, pero no se acumulan, razón por la cual se encuentran en muy pequeña cantidad. Generalmente uno de los grupos –OH libres en el resto fosfato es esterificado por otro componente. De acuerdo con la naturaleza de éste, resultan distintos glicerofosfolípidos. Cuando se agrega *colina*, un aminoalcohol, se tiene *fosfatidilcolina*, también denominada lecitina (fig. 5-6); si el aminoalcohol es *etanolamina*, se obtiene *fosfatidiletanolamina* o cefalina. Los nombres lecitina y cefalina tienden a ser abandonados.



Colina

Etanolamina



Fosfatidilcolina

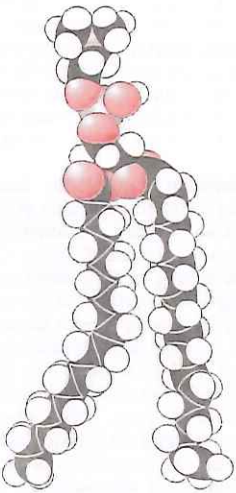
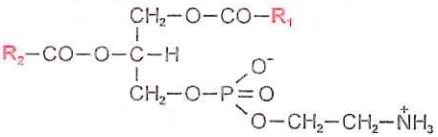
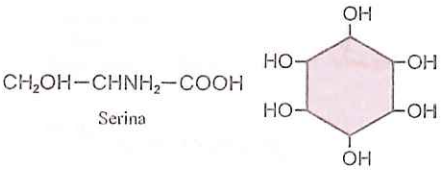


Fig. 5-6. Modelo molecular espacial compacto de fosfatidilcolina. C: negro; H: blanco; O: rojo; P: gris; N: rosado.

Si el componente agregado a ácido fosfatídico es el aminoácido *serina*, se tiene *fosfatidilserina*; si es el polialcohol cíclico *inositol*, se forma *fosfatidilinositol*. El inositol es un hexalcohol cíclico; el isómero más abundante en la naturaleza es el mesoinositol. Cuando todas las funciones hidroxilo están saturadas por radicales fosfato se forma el *hexaquisfosfatoinositol* o ácido fítico.



Fosfatidiletanolamina



Serina

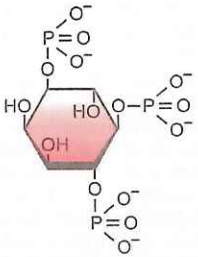
Inositol

A pH fisiológico, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina son moléculas neutras, se comportan como iones dipolares o *zwitterions*. Fosfatidilserina y fosfatidilinositol tienen carga neta –1 y carácter acídico.

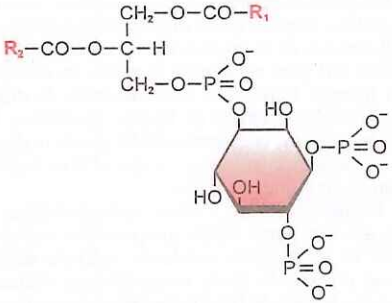
Un fosfolípido de importancia funcional es *fosfatidilinositolbisfosfato*. A diferencia de los fosfolípidos mencionados, posee tres grupos fosfato en lugar de uno. Los dos grupos adicionales están unidos a –OH de carbonos 4 y 5 de inositol. El compuesto se encuentra en membranas celulares. En respuesta a señales externas (hormonas, intermediarios químicos), se hidroliza en diacilglicerol e inositoltrisfosfato (1,4,5-trisfosfatoinositol); ambos productos de la hidrólisis actúan como "segundos mensajeros" de sistemas de transmisión de señales (pág. 492).

Meso-Inositol

Isómero más abundante en la naturaleza



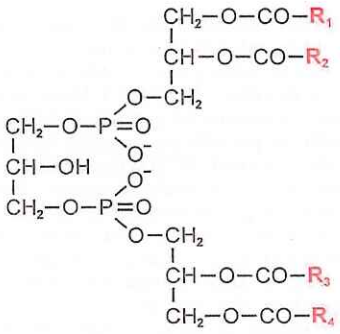
Inositol-1,4,5-trisfosfato



Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato

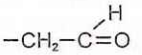
En los últimos años se ha reconocido la importancia de inositol polifosfatos e inositol pirofosfatos, derivados del inositol con alta proporción de grupos fosfatos capaces de regular diversos procesos biológicos

En membrana interna de mitocondrias y en el líquido que cubre el epitelio de alvéolos pulmonares, suele encontrarse fosfatidilglicerol, compuesto acídico, de carga –1. Otro componente de membrana mitocondrial interna y también de membranas bacterianas, es la *cardiolipina*, constituida por dos moléculas de ácido fosfatídico unidas a una molécula de glicerol mediante enlaces fosfodiéster; es acídica, con carga –2.

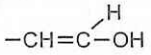


Cardiolipina

Plasmalógenos. Son glicerofosfolípidos semejantes a los anteriores, es decir, poseen glicerol, ácido fosfórico, base nitrogenada (colina o etanolamina) y un ácido graso. La diferencia estriba en la existencia, en C1 del glicerol, de un enlace tipo *éter* a un *aldehído graso* de cadena larga, en lugar de un éster de ácido graso. El aldehído graso adquiere con facilidad la forma enólica, por trasposición de un hidrógeno y migración de la doble ligadura.

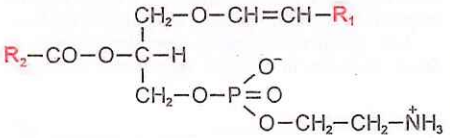


Aldehído



Enol

El aldehído graso, en su forma enólica, se une con el alcohol primario del glicerol con pérdida de agua. El aldehído graso puede ser palmital, con 16 carbonos, o cualquier otro aldehído derivado de ácidos grasos. Los plasmalógenos se encuentran en membranas celulares, especialmente musculares y nerviosas.



Plasmalógeno

Propiedades de glicerofosfolípidos. Los glicerofosfolípidos presentan gran diversidad en su composición en ácidos grasos. Por ejemplo, fosfatidilcolina con ácidos palmítico y esteárico es distinta de otra con mirístico y oleico. Por eso se habla en plural de fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilserinas, etc.

Algunos glicerofosfolípidos poseen sus dos ácidos grasos saturados o insaturados; pero la mayoría tiene un ácido graso saturado en posición 1 y otro no saturado en posición 2. Fosfatidilcolina contiene frecuentemente palmitoil (16:0) o estearoil (18:0) en posición *sn*-1 y restos insaturados, oleil (18:1), linoleil (18:2) o linolenoil (18:3) en posición *sn*-2. Fosfatidiletanolamina tiene los mismos ácidos grasos saturados en posición *sn*-1, pero con frecuencia ácidos insaturados de cadena más larga (20, 22 C) en *sn*-2. El fosfatidilinositol, casi exclusivamente esteárico (18:0) en *sn*-1 y araquidónico (20:4) en *sn*-2.

La molécula de glicerofosfolípidos presenta una zona o cabeza polar, que comprende el grupo –OH acídico libre del resto fosforilo y el nitrógeno básico de los aminoalcoholes. Las dos ramas o "colas" carbonadas de ácidos grasos son apolares (fig. 5-7). Es decir, se trata de compuestos *anfipáticos* o *anfifílicos*.

La acentuada polaridad de glicerofosfolípidos es una característica importante porque, junto con su tamaño y forma, tienen papel muy significativo en la constitución de membranas celulares. Incluidos en la doble capa lipídica que forma la estructura básica de membranas, se disponen con su cabeza polar dirigida hacia el medio acuoso, ya sea del exterior o del citosol, mientras las cadenas apolares de restos acilos se orientan hacia el centro de la membrana.

En algunos venenos de serpientes hay enzimas que catalizan la hidrólisis de glicerofosfolípidos (fosfolipasas). Una de ellas, fosfolipasa A_2, promueve la hidrólisis de la función éster en posición 2. Esta reacción produce un cambio estructural de la membrana en la cual está incluido el fosfolípido y se favorece la lisis celular; de allí el nombre de *lisoderivados* dado a los glicerofosfolípidos a los cuales les falta el ácido graso del C *sn*-2. El ataque de fosfolipasa A_2 a fosfatidilcolina produce un ácido graso y *lisofosfatidilcolina*

Los glicerofosfolípidos son detergentes, es decir, reducen la tensión superficial del agua.

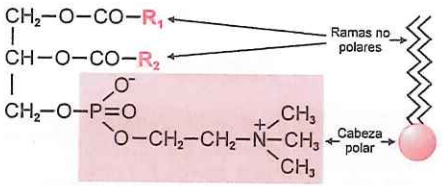


Fig. 5-7. A la derecha, representación esquemática de un glicerofosfolípido.

Su presencia en una suspensión acuosa de compuestos hidrófobos, como grasas neutras y colesterol, contribuye a estabilizarla. Las propiedades detergentes de fosfolípidos son importantes en la bilis, en la cual contribuyen a solubilizar el colesterol. Otra función relacionada con sus propiedades tensioactivas, se ejerce en pulmón, previniendo la oclusión de los alvéolos. En células epiteliales tipo II del alvéolo pulmonar se sintetizan y secretan hacia la luz sustancias que forman el llamado "surfactante" (anglicismo derivado de *surfactant*, que podría traducirse como "detergente de superficie"). Este material es un complejo lipoproteínico, 80 a 90% del cual está constituido por lípidos y el resto por proteínas de 18 a 26 kDa. La mitad de los lípidos del "surfactante" corresponde a un fosfolípido característico, la *dipalmitoil-fosfatidilcolina*. Es un compuesto inusual porque contiene ácido saturado, palmítico (16:0), en ambas posiciones *sn*-1 y *sn*-2. También se encuentra *fosfatidilglicerol*. La capacidad para sintetizar estas sustancias y excretarlas hacia el espacio aéreo del alvéolo se desarrolla durante la vida intrauterina y alcanza un nivel normal alrededor del octavo mes de gestación. Los niños nacidos prematuramente pueden padecer severos trastornos (síndrome de distrés respiratorio) por deficiencias en la producción de surfactante. Un índice útil para establecer el grado de madurez del pulmón fetal es la concentración de dipalmitoil-fosfatidilcolina en líquido amniótico. En recién nacidos, la determinación puede realizarse en contenido gástrico, ya que el feto deglute líquido amniótico *in utero*.

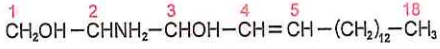
Fosfatidilinositol y otros fosfoglicéridos, en adición a su papel como componentes estructurales de membranas celulares, también actúan como reserva de ácido araquidónico, utilizado para la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos. Fosfatidilinositol, además, se une a proteínas y sirve como "ancla" que ayuda a fijarlas a la superficie externa de membrana plasmática.

Un glicerofosfolípido de características especiales es el llamado *factor activante de plaquetas*. Es un 1-O-alquil-2-acetil-gliceril-fosforil-colina. Difiere de fosfatidilcolina por tener en posición *sn*-1 un resto alquilo de 16 C unido por enlace éter, en lugar de éster, y en posición *sn*-2, un resto acetato en vez de acilo de cadena larga. El factor activante de plaquetas (PAF en las siglas del nombre inglés) es una sustancia de gran actividad funcional. Entre otras acciones, produce agregación de plaquetas, reduce la presión sanguínea, es mediador en procesos inflamatorios.

Esfingofosfolípidos

El más abundante es *esfingomielina*, constituida por: a) un alcohol llamado *esfingol* o *esfingosina*, b) un ácido graso, c) ácido fosfórico y d) colina.

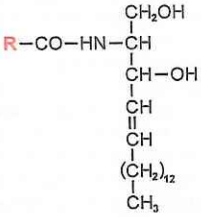
a) Esfingosina tiene 18 átomos de carbono. En C1 posee una función alcohol; en C2, una función amina; en C3, un alcohol secundario y entre C4 y C5, una doble ligadura. El resto es cadena hidrocarbonada saturada.



Esfingosina

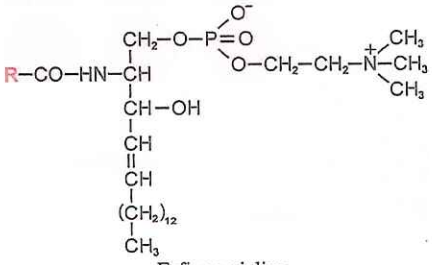
(En rojo se indica la numeración de los carbonos)

b) A diferencia de los compuestos hasta aquí considerados, en los cuales los ácidos grasos están unidos por funciones éster, el ácido graso se fija a la amina de C2 de esfingosina, se genera una función amida. Esta estructura básica, formada por esfingosina y ácido graso en unión amídica, se denomina *ceramida*.



Ceramida

c) El ácido fosfórico esterifica el –OH de C1 de esfingosina y d) la colina se une al fosfato como en la fosfatidilcolina.



Esfingomielina

La esfingomielina es un importante componente de membranas en el tejido nervioso, especialmente en las vainas de mielina. Tiene, como los glicerofosfátidos, una cabeza polar (fosfato y colina) y dos colas o ramas no polares (cadenas hidrocarbonadas de ácido graso y esfingol) (fig. 5-9 y 5-10).

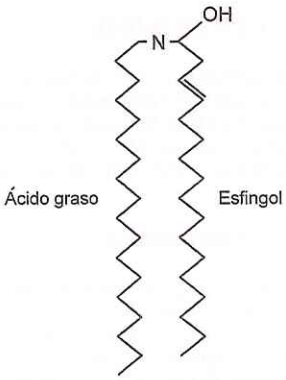


Fig. 5-8. Representación esquemática de ceramida.

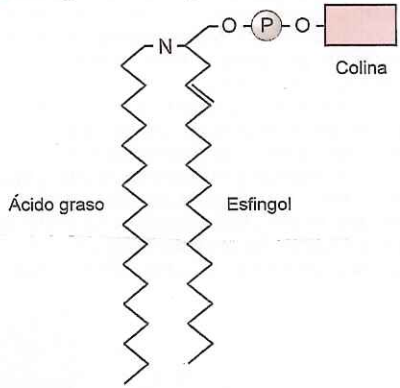


Fig. 5-9. Representación esquemática de esfingomielina.

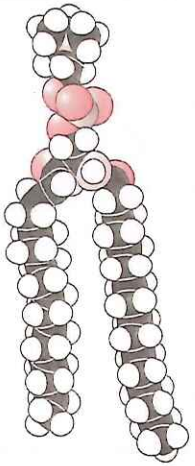


Fig. 5-10. Modelo molecular espacial compacto de esfingomielina. C: negro; H: blanco; O: rojo; P: gris; N: rosado.

GLICOLÍPIDOS

Poseen carbohidratos en su molécula; no tienen fosfato. Los más abundantes en animales superiores son glicoesfingolípidos, de los cuales se considerarán *cerebrósidos* y *gangliósidos*. Todos ellos son compuestos anfipáticos, integrantes de membranas.

Cerebrósidos

Compuestos neutros, formados por ceramida (esfingosina y ácido graso) y un monosacárido unido por enlace glicosídico β al C1 de esfingol. Frecuentemente el glúcido es galactosa; se tiene un galactocerebrósido (fig. 5-11). Los ácidos grasos más comunes son lignocérico e hidroxilignocérico o cerebrónico, ambos de 24 carbonos. El cerebrósido con ácido lignocérico recibe el nombre de *querasina*; si tiene ácido cerebrónico, *frenosina* o *cerebrona*.

Junto a galactocerebrósidos se encuentran, en muy pequeña proporción, glucocerebrósidos, es decir, glicolípidos con glucosa unida a ceramida.

Los cerebrósidos abundan en sustancia blanca de cerebro y en vainas de mielina; se los ha encontrado, en reducidas cantidades, en membranas de otros tejidos. En sustancia blanca de cerebro y, en menor proporción, en otros tejidos, se han aislado lípidos con azufre. Estos compuestos, anteriormente llamados *sulfátidos*, generalmente son galactocerebrósidos en los cuales el monosacárido es esterificado por ácido sulfúrico.

Se han identificado glicoesfingolípidos con la porción glucídica más compleja (di, tri y tetrasacáridos en lugar de monosacárido). Los compuestos de este tipo que contienen N-acetil-galactosamina son llamados *globósidos*.

Gangliósidos

Son otro grupo importante de glicoesfingolípidos. Su estructura básica es similar a la de cerebrósidos, pero la porción glucídica es de mayor complejidad. Unido a la ceramida poseen un oligosacárido compuesto por varias hexosas y 1 a 3 restos de ácido acetilneuramínico (ácido siálico).

Se han reconocido muchos tipos de gangliósidos que difieren en el número de restos de hexosas y ácidos siálicos y en la posición relativa de estos restos. En casi todos los gangliósidos, el primer resto de hexosa del oligosacárido unido a ceramida es glucosa. A continuación suelen disponerse galactosa, N-acetilgalactosamina y otra glucosa o galactosa, todas unidas por enlaces glicosídicos β. Según la notación más utilizada, los gangliósidos se designan con la letra G seguida de un subíndice que señala el número de restos de ácido siálico existentes en la molécula (G_M: mono-, G_D: di- y G_T: trisialogangliósido). A continuación, otro subíndice señala el orden de migración del compuesto en cromatografía. El compuesto esquematizado en la figura 5-12 corresponde al monosialogangliósido G_{M2}.

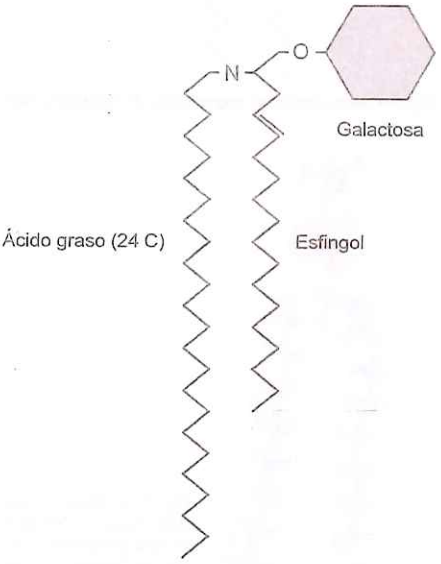


Fig. 5-11. Representación esquemática de un cerebrósido.

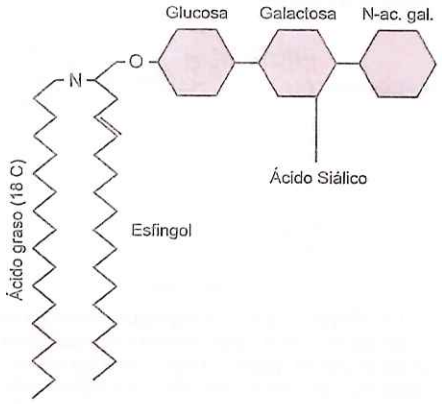


Fig. 5-12. Representación esquemática de un ganglósido.

Los gangliósidos no son sólo un componente estructural más de membranas celulares. Al parecer, ejercen también el papel de "marcadores". Por ejemplo, la etapa previa a la acción patógena de toxinas bacterianas como las del cólera, tétanos, botulismo y difteria, es la unión selectiva a gangliósidos de superficies celulares. Si antes de su contacto con las células se incuba la toxina con el ganglíósido específico, se bloquea el sitio de unión de la toxina y ésta se torna inocua. Los gangliósidos de superficie sirven también como sitio específico de fijación para otras moléculas, como el interferón, poderoso agente antiviral.

Lipoproteínas

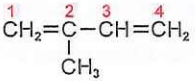
Los lípidos que llegan al torrente circulatorio son vehiculizados en el medio acuoso del plasma sanguíneo gracias a su asociación a proteínas. La cantidad y tipo de lípidos que forman estas agrupaciones moleculares varían para las distintas clases de lipoproteínas existentes en el plasma (págs. 61 y 292). En el complejo formado, los lípidos hidrófobos (triacilgliceroles y colesterol esterificado) se ubican en el interior y los grupos polares de proteínas, lípidos complejos y colesterol libre se disponen en la superficie.

Entre los componentes de membranas de mitocondrias, microsomas, vainas mielínicas, etc., se encuentran lipoproteínas.

SUSTANCIAS ASOCIADAS A LÍPIDOS

Terpenos

Son compuestos derivados del hidrocarburo *isopreno* o 2-metil-1,3-butadieno.

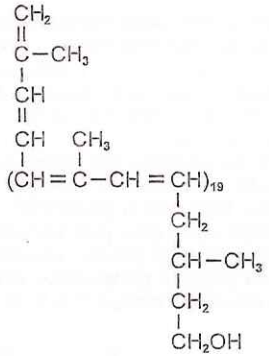


Isopreno

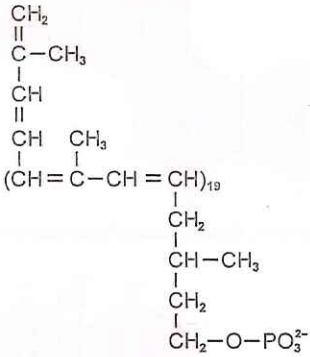
Por unión de dos o más unidades isopreno se forman *terpenos* o *poliisoprenos*. La unión generalmente se produce entre C4 de una molécula de isopreno y C1 de la siguiente.

Los poliisoprenos pueden presentar estructura lineal, como *geraniol* (formado por dos unidades isopreno), *farnesol* (constituido por tres isoprenos), o *escualeno* (por seis isoprenos), o formar ciclos, como en la vitamina A, los carotenos, el lanosterol, la ubiquinona, etc.

Los *poliprenoles* pertenecen a este grupo de sustancias. Entre ellos citaremos dolicol, constituido por una larga cadena de 17 a 21 unidades isoprénicas (85 a 105 carbonos). Algunos de sus dobles enlaces tienen configuración trans; el resto isoprenilo inicial, con una función alcohol, es saturado. Esterificado con fosfato (dolicolfosfato), participa en la biosíntesis de glicoproteínas (pág. 283).



Dolicol



Dolicol-fosfato

Esteroles

Son derivados de *ciclopentanoperhidrofenantreno*. Esta molécula está formada por perhidrofenantreno, derivado saturado de fenantreno (fig. 5-13), condensado con un anillo pentagonal ciclopentano.

Los anillos se designan con letras y los carbonos se numeran según indica la figura 5-13 .

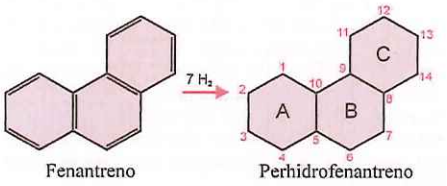


Fig. 5-13.

Del ciclopentanoperhidrofenantreno derivan compuestos de gran importancia biológica, entre ellos hormonas sexuales y adrenocorticales, ácidos biliares, vitaminas D, esteroles, etc. Todas las sustancias que poseen este núcleo reciben el nombre de *esteroides*.

A todos los carbonos del núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno se los considera ubicados en un plano. Esto crea la posibilidad de isomería geométrica (*cis-trans*), pues los sustituyentes unidos a esos carbonos pueden colocarse a uno u otro lado del plano. El núcleo posee, además, seis centros de asimetría (carbonos 5, 8, 9, 10, 13 y 14),

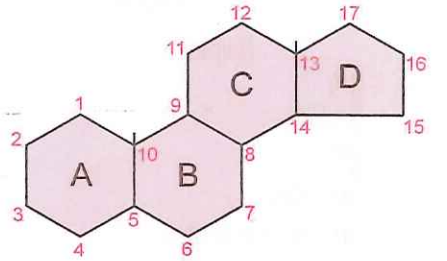


Fig. 5-14. Ciclopentanoperhidrofenantreno.

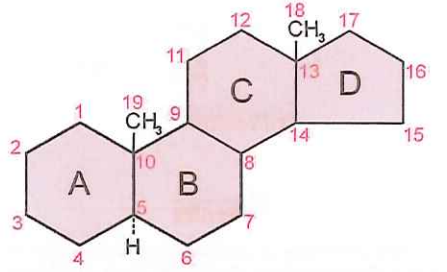


Fig. 5-15. Ciclopentanoperhidrofenantreno con metilos en C10 y C13. Los carbonos adicionales, numerados 18 y 19, están unidos al núcleo por una línea llena para indicar que están sobre el plano de la molécula. El H de C5 está unido con una línea de trazo cortado, pues se encuentra por debajo del plano (isómero A/B *trans*).

lo que supone la existencia de gran número de isómeros. En la naturaleza sólo se presentan isómeros de carbono 5, mientras los sustituyentes en los restantes carbonos asimétricos tienen igual posición relativa en todos los compuestos de interés biológico.

En la molécula plana de ciclopentanoperhidrofenantreno, los hidrógenos o grupos sustituyentes unidos a sus carbonos pueden colocarse por encima o por debajo del plano. Los ubicados hacia arriba se denominan β y se representan uniéndolos a su carbono por un trazo continuo; los situados hacia abajo son designados α y se los une con un trazo cortado (fig. 5-15).

En la gran mayoría de esteroides naturales existen grupos metilo unidos a carbonos 10 y 13 (los carbonos de esos metilos llevan los números 19 y 18 respectivamente). En los compuestos de interés en bioquímica humana, los carbonos 18 y 19 están en la misma posición relativa, por encima del plano (β). El metilo de carbono 10 (C19) sirve de referencia; se considera β (*cis*) al H de C5 o a cualquier otro sustituyente cuando está del mismo lado del plano que el C19, o α (*trans*) si está del otro lado.

En realidad, los anillos hexagonales A, B y C de ciclopentanoperhidrofenantreno no forman un plano; adoptan la conformación en "silla", más estable. El esquema de la figura 5-16 indica la conformación de esteroides con los anillos A-B en posición *trans*.

Si en el carbono 17 se une una cadena hidrocarbonada ramificada de ocho carbonos y se introduce un grupo hidroxilo (–OH) en carbono 3, se tiene la estructura básica de *esteroles*. En estos compuestos, al agregar el grupo funcional –OH se originan nuevos isómeros *cis-trans* según la posición del –OH con respecto al metilo de C10. Con el –OH de carbono 3 en el mismo lado del plano que el metilo son isómeros *cis* o β; cuando el –OH está del otro lado, trans o α.

Los esteroles existen como alcoholes libres o como ésteres de ácidos grasos de cadena larga.

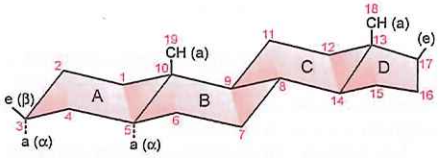


Fig. 5-16. Conformación espacial de ciclopentanoperhidrofenantreno. Los ciclos hexagonales adoptan forma "silla". La fórmula representada corresponde al isómero A/B *trans*. La dirección de los enlaces está indicada por *a*: axial y *e*: ecuatorial.

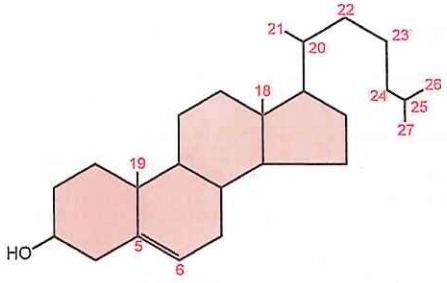


Fig. 5-17. Colesterol

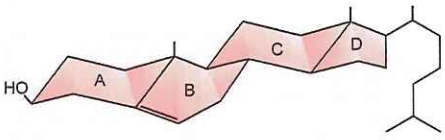


Fig. 5-18. Conformación espacial de la molécula de colesterol. La presencia de una doble ligadura entre los carbonos 5 y 6 deforma el anillo B.

La esterificación se efectúa entre el –OH de C3 y el carboxilo del ácido graso.

El esterol más abundante en tejidos animales es el *colesterol*. Se encuentra tanto libre como esterificado. El colesterol posee el –OH de C3 en posición *cis* o β y una doble ligadura entre carbonos 5 y 6 (fig. 5-17). Se presenta como un sólido de color blanco, insoluble en agua, muy soluble en cloroformo, benceno, etc. Este compuesto está relacionado con algunos cuadros patológicos. En la aterosclerosis es común el aumento de colesterol en plasma sanguíneo y el depósito de esta sustancia en paredes vasculares.

La figura 5-18 muestra la conformación de la molécula de colesterol. La presencia del doble enlace entre carbonos 5 y 6 modifica la disposición del anillo B. Como no existe H en C5, no hay isómeros A/B *cis-trans* en este compuesto.

El colesterol es la materia prima a partir de la cual el organismo sintetiza una serie de compuestos de intensa actividad biológica: hormonas adrenocorticales y sexuales, ácidos biliares, etc. El colesterol está presente en casi todas las grasas animales. En el plasma se lo encuentra al estado libre y esterificado. Es particularmente abundante en bilis, de la cual puede precipitar dando lugar a formación de cálculos en vesícula o en vías biliares. Este cuadro patológico, denominado litiasis biliar, es muy frecuente.

Otro esterol presente en organismos animales es *7-deshidrocolesterol* (fig. 5-19). Su fórmula es similar a la de colesterol con adición de otra doble ligadura entre carbonos 7 y 8. Es una provitamina; por irradiación con luz ultravioleta se transforma en vitamina D_3.

De los esteroles vegetales, el más importante es *ergosterol* (fig. 5-20). Su estructura química es

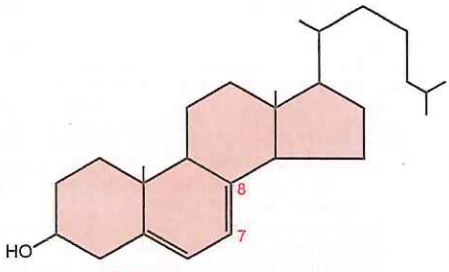


Fig. 5-19. 7-deshidrocolesterol.

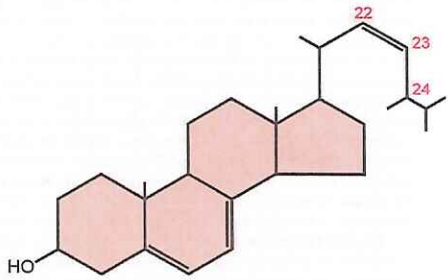


Fig. 5-20. Ergosterol.

similar a la de 7-deshidrocolesterol, con un doble enlace adicional entre carbonos 22 y 23 y un metilo en carbono 24. Este compuesto también se convierte en vitamina D por irradiación con luz solar.

RESUMEN

Los lípidos son un grupo heterogéneo de sustancias cuya característica común es ser insolubles o poco solubles en agua y solubles en solventes orgánicos. Son componentes esenciales de seres vivos. En casi todos estos compuestos, forman parte de la molécula ácidos orgánicos monocarboxílicos, llamados *ácidos grasos*.

Ácidos grasos (AG). Los lípidos de origen animal contienen ácidos monocarboxílicos de cadena lineal; la gran mayoría con número par de C (de 4 a 26); los más abundantes son de 16 y 18 C. Pueden ser saturados o insaturados, y éstos, monoetilénicos o polietilénicos. Corrientemente se los designa por su nombre común o trivial; los más importantes son: *Saturados*: butírico (4C); caproico (6C); caprílico (8C); cáprico (10C); láurico (12C); mirístico (14C); palmítico (16C); esteárico (18C); araquídico (20C); lignocérico (24C). *Monoetilénicos*: palmitoleico (16C) (doble ligadura entre C9 y C10, indicada con la notación 16:1 Δ9); oleico (18C) (18:1 Δ9). *Dietilénico*: linoleico (18C) (dobles enlaces entre C9 y 10 y entre C12 y 13 (18:2 Δ9,12). *Trietilénico*: linolénico (18:3 Δ9,12,15). *Terraetilénico*: araquidónico (20:4 Δ5,8,11,14). Existe otra notación que indica la posición de los dobles enlaces en relación con el C distal a la función –COOH (Cω). Oleico es 18:1 ω9; linoleico, 18:2 ω6; linolénico, 18:3 ω3; araquidónico, 20:4 ω6. *Propiedades de AG*: a) A medida que la cadena carbonada se hace más larga, predomina la porción hidrófoba sobre el grupo –COOH polar y la solubilidad en agua disminuye. Los AG de más de 6 C son prácticamente insolubles en agua. b) Las temperaturas de fusión y ebullición aumentan con la longitud de la cadena. De 1 a 8 C son líquidos a 20°C. Los de mayor número de C son sólidos a temperatura ambiente. La presencia de enlaces etilénicos disminuye la temperatura de fusión. c) La rigidez del doble enlace en ácidos grasos etilénicos crea la posibilidad de isomería geométrica. La casi totalidad de AG insaturados naturales tienen configuración *cis*. Los dobles enlaces en isómeros *cis* producen angulación de la cadena. d) Al aumentar el número de C, disminuye el carácter acídico. e) Si el grupo –COOH reacciona con una base, se forma una sal. Estas sales de AG se llaman *jabones*. Los de metales alcalinos (Na, K) son muy solubles y actúan como emulsionantes o detergentes. f) Los AG reaccionan con alcoholes formando ésteres. AG insaturados se oxidan más fácilmente a nivel del doble enlace formando peróxidos. Por hidrogenación en presencia de un catalizador, los AG etilénicos se saturan. AG insaturados adicionan fácilmente halógenos; en condiciones controladas, la cantidad de halógeno consumida por una cantidad determinada de AG refleja la cantidad de dobles ligaduras (número de yodo).

Los lípidos se clasifican en *simples* y *complejos*. Lípidos simples: acilgliceroles y ceras; complejos: fosfolípidos, esfingofosfolípidos, glicolípidos y lipoproteínas.

Lípidos simples. *Acilgliceroles*. Son ésteres de AG con glicerol. Según el número de funciones alcohólicas esterificadas, se tienen monoacilgliceroles, diacilgliceroles y triacilgliceroles. Triacilgliceroles son también llamados triacilglicéridos o grasas neutras. Si los AG que constituyen la molécula son todos iguales, se tienen homoacilgliceroles; si son diferentes, heteroacilgliceroles. Muchos acilgliceroles presentan isomería óptica; los que se encuentran en la naturaleza pertenecen a la serie L. Grasas neutras son los lípidos más abundantes en la constitución de seres vivos. Representan material de reserva energética. Como integrantes del panículo adiposo de animales cumplen también función de protección mecánica y aislamiento térmico. *Propiedades*: acilgliceroles son prácticamente insolubles en agua. Su temperatura de fusión depende de los AG constituyentes; los que tienen AG saturados de cadena larga funden a mayor temperatura. El predominio de AG insaturados o saturados de cadena corta es responsable del estado líquido de una grasa natural a temperatura ambiente (ej.: aceites vegetales). Si se calienta una grasa neutra en presencia de bases fuertes (KOH, NaOH), queda glicerol libre y se forman jabones; este proceso se llama *saponificación*. Por hidrogenación de aceites se obtienen grasas sólidas (margarinas). Por oxidación se producen primero peróxidos y posteriormente ruptura de cadenas de AG originando compuestos de olor y sabor a rancio. Las grasas tienen importancia en nutrición. Su valor calórico es muy superior al de otros principios de la dieta (38,9 kJ/g o 9,3 kcal/g). Ácidos linoleico, linolénico y araquidónico (poliinsaturados) son *esenciales;* el organismo no los sintetiza, deben ser provistos con los alimentos. Ceras: ésteres de alcoholes monovalentes de cadena larga y AG superiores.

Lípidos complejos. *Fosfolípidos*. Formados por un alcohol, AG y ácido fosfórico. Según el alcohol componente, se dividen en glicerofosfolípidos y esfingofosfolípidos. *Glicerofosfolípidos*. Principales componentes de membranas celulares. Son derivados de *ácidos fosfatídicos*, moléculas formadas por glicerol esterificado por AG en C1 y 2 y por ácido fosfórico en C3. El C2 es asimétrico. Los glicerofosfolípidos resultan de esterificar uno de los –OH libres del resto fosfato de ácido fosfatídico. Se tienen distintos glicerofosfolípidos: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol. El fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato actúa en un sistema de transmisión de señales en membranas celulares. *Plasmalógenos*: son similares a los otros glicerofosfolípidos, excepto que contienen aldehído graso en lugar de uno de los AG. Las moléculas de glicerofosfolípidos son moléculas anfipáticas; tienen una porción polar (que comprende al –OH del resto fosfato y al N básico de restos aminoalcoholes, –OH de serina e inositol) y otra apolar (cadenas carbonadas de AG). La hidrólisis de la unión éster que une el AG a C2 libera AG y un *lisoderivado*. *Esfingofosfolípidos*. El más abundante es *esfingomielina*, formada por: a) alcohol de 18 C, esfingol o esfingosina; b) AG; c) ácido fosfórico, y d) colina. El AG no forma éster sino amida con la función $–NH_2$ de C2 de esfingosina. Esfingol y AG constituyen *ceramida*, estructura básica de distintos esfingolípidos.

Glicolípidos. No poseen fosfato. Comprenden cerebrósidos, gangliósidos y sulfolípidos. *Cerebrósidos*: formados por ceramida y un monosacárido unido por enlace β glicosídico a C1 de esfingol. Comúnmente el monosacárido es galactosa. El AG suele ser de 24 C (lignocérico en querasina; cerebrónico en frenosina). Cerebrósidos son abundantes en sustancia blanca de cerebro y en vainas de mielina. *Gangliósidos*: formados por ceramida y un oligosacárido compuesto por varias hexosas y 1 a 3 restos N-acetil neuramínico. Tienen importantes funciones; actúan como moléculas

"marcadoras" en la superficie de membranas que pueden ser reconocidas selectivamente por otras moléculas (toxinas, interferón). *Sulfolípidos* o *sulfátidos*: son galactocerebrósidos con azufre. *Lipoproteínas*. Son complejos en los cuales los lípidos hidrófobos (triacilgliceroles y colesterol esterificado) se disponen en el interior y los grupos polares de proteína, lípidos complejos y colesterol libre, en la superficie.

Sustancias asociadas a lípidos. *Terpenos*: derivados del hidrocarburo *isopreno*. Algunos tienen molécula lineal (geraniol, farnesol, escualeno, poliprenoles); otros presentan estructuras cíclicas (vitamina A, carotenos, lanosterol, ubiquinona). Un poliprenol de interés es *dolicol*, con una cadena de 17 a 21 unidades isopreno. *Esteroles*: derivados de ciclopentanoperhidrofenantreno. Todas las sustancias con este núcleo se llaman *esteroides* (esteroles, hormonas sexuales y adrenocorticales, ácidos biliares, vitamina D). El plano formado por el ciclo crea posibilidades de isomería geométrica. Cuando un sustituyente en uno de los C del ciclo se encuentra del mismo lado del plano que el metilo de C10, el isómero es *cis* o β; si, en cambio, se dispone del otro lado, es *trans* o α. *Colesterol*, esterol con una cadena ramificada de 8 C en C17, hidroxilo en C3 y doble enlace entre C5 y C6. Sólo se encuentra en tejidos animales; hormonas esteroides y ácidos biliares se sintetizan a partir de colesterol. El 7-deshidrocolesterol es una provitamina D. En vegetales, el esterol más importante es *ergosterol*.

BIBLIOGRAFÍA

Angerer P., von Schacky C. (2000). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and the cardiovascular system. *Current Opinion on Lipidology*, 11: 57-63.

Belury M.A. (2002). Dietary conjugated linoleic acid in health: Physiological effects and mechanisms of action. *Annual Review of Nutrition*, 22: 505-531.

Gurr M.I., Harwood J.L., Frayn K.N. (2002). *Lipid Biochemistry: An Introduction*, 5ta. Ed., Blackwell Science Ltd., Oxford.

Mozaffarian D., Katan M.B., Ascherio P.H., Stampfer M.J., Willet W.C. (2006). Trans fatty acids and cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine*, 354: 1601-1613.

Vance D.E., Vance J.E. (2002). Biochemistry of lipids, Lipoproteins and Membranes. *New comprehensive Biochemistry*, Vol. 36, Elsevier Science Publishing Co. Inc. Nueva York.

Wijendren V., Hayes K.C. (2004). Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance in cardiovascular health. *Annual Review of Nutrition*, 24: 597-615.

CAPÍTULO 6

Ácidos nucleicos

Los *ácidos nucleicos* son compuestos aislados originalmente de un material rico en núcleos celulares; de allí su nombre.

Contienen carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y fósforo, poseen carácter acídico y se encuentran en todos los seres vivientes. Son macromoléculas formadas por polimerización, en cadenas lineales, de unidades estructurales llamadas *nucleótidos*.

Los ácidos nucleicos son sustancias del más alto rango biológico; a ellos les están asignadas importantísimas funciones: a) Son depositarios de la información genética y responsables de su transmisión de padres a hijos y de una generación celular a otra. b) Tienen un papel fundamental en la síntesis de proteínas en las células y dirigen el ensamble correcto de aminoácidos en secuencias definidas. En última instancia, la individualidad y el potencial funcional de cada ser son determinados por la información contenida en sus ácidos nucleicos.

Consideraremos en primer término la estructura de las unidades constituyentes, los nucleótidos.

NUCLEÓTIDOS

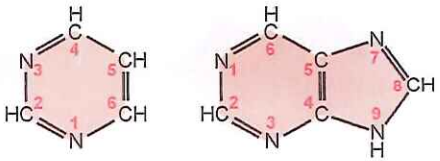
Los nucleótidos, unidades cuya polimerización forma los ácidos nucleicos, son sustancias constituidas por: a) una base nitrogenada, b) un monosacárido de cinco carbonos (aldopentosa) y c) ácido fosfórico.

Bases nitrogenadas. Por hidrólisis de nucleótidos se obtienen sustancias derivadas de los núcleos heterocíclicos *pirimidina* y *purina*. Se habla de bases pirimidínicas o pirimídicas y bases purínicas o púricas. En la figura 6-1 se indica la constitución de esos núcleos y la numeración de sus elementos. La purina se considera derivada de pirimidina por fusión a ésta de un núcleo imidazol. Ambos ciclos tienen todos sus átomos ubicados en el mismo plano.

Cinco bases derivadas de estos núcleos participan en la composición de ácidos nucleicos; tres de ellas son pirimídicas y dos púricas. Las bases pirimídicas son *timina* (5-metil-2,4-dioxipirimidina), *citosina* (2-oxo-4-aminopirimidina) y *uracilo* (2,4-dioxipirimidina) (fig. 6-2).

Las bases púricas son *adenina* (6-aminopurina) y *guanina* (2-amino-6-oxipurina) (fig. 6-3).

Las fórmulas de bases pirimídicas y de guanina en las figuras 6-2 y 6-3, respectivamente, corresponden a la forma cetónica o lactama, predominante en productos naturales. En menor proporción se encuentran isómeros (tautómeros) de forma enólica o lactima (se producen por desplazamiento hacia el oxígeno del H unido al N vecino). Eventualmente, los ácidos nucleicos pueden contener una pequeña cantidad de otras bases, en general derivadas de las anteriores, como 5-metil-citosina, por ejemplo.



Pirimidina Purina

Fig. 6-1. La numeración de los elementos del núcleo pirimidina se hace en sentido distinto al de purina. Sólo los carbonos 2 y 5 tienen el mismo número en ambos núcleos

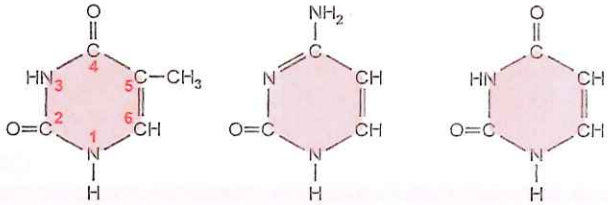


Fig. 6-2. Bases pirimídicas.

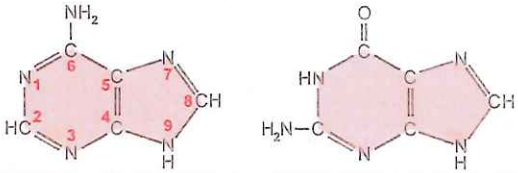


Fig. 6-3. Bases púricas.

Bases pirimídicas y púricas tienen la propiedad de absorber radiaciones en la región ultravioleta del espectro, con un máximo a la longitud de onda de 260 nm. Esta característica se debe a la naturaleza aromática de las bases y se utiliza para detectar su presencia en una muestra y estimar su concentración por espectrofotometría.

Aldopentosas. El monosacárido integrante de la molécula de ácidos nucleicos puede ser *D-ribosa* o *D-2-desoxirribosa*. Según la pentosa presente, se distinguen ácidos ribonucleicos (ARN o RNA en las siglas inglesas) y ácidos desoxirribonucleicos (ADN o DNA). Las aldopentosas de ácidos nucleicos adoptan la forma furanosa (fig. 6-4).

Ribosa o desoxirribosa se unen al nitrógeno 9 de bases púricas o al nitrógeno 1 de bases pirimídicas mediante enlace glicosídico β (está involucrado el carbono 1 de la pentosa, en configuración β).

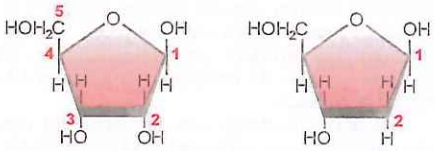


Fig. 6-4. Aldosas componentes de ácidos nucleicos.

La unión glicosídica permite libre rotación. El compuesto formado por una base nitrogenada, púrica o pirimídica, y aldopentosa, se llama *nucleósido*. La disposición espacial relativa de la base nitrogenada y del monosacárido puede variar entre los dos extremos representados en la figura 6-5, correspondientes a las formas *sin* y *anti*. Esta última es termodinámicamente más favorable.

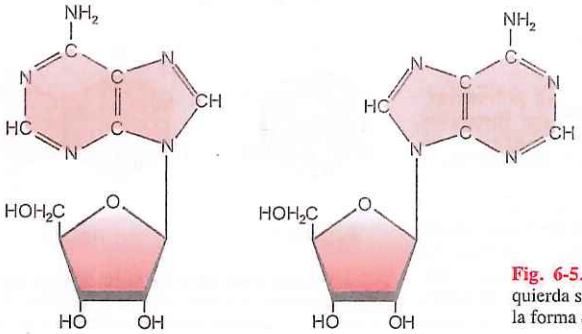


Fig. 6-5. Adenosina (nucleósido). A la izquierda se muestra la forma sin; a la derecha, la forma *anti*.

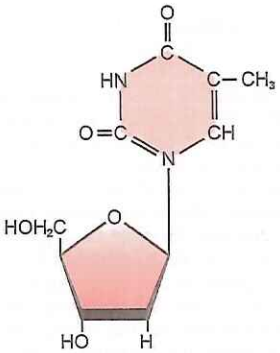


Fig. 6-6. Timidina (nucleósido).

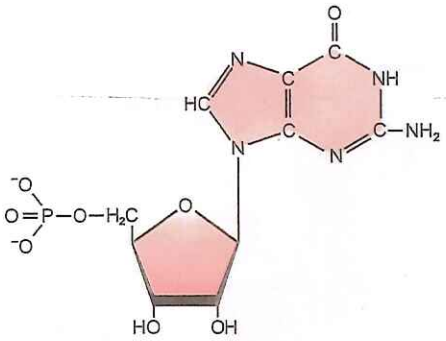


Fig. 6-7. Ácido guanílico o guanosina monofosfato (nucleótido, forma *anti*).

Un *nucleótido* se forma por esterificación con ácido fosfórico del hidroxilo del carbono 5 de la ribosa o desoxirribosa de un nucleósido. La tabla 6-1 presenta los nucleósidos y nucleótidos más comunes.

ÁCIDOS NUCLEICOS

Para formar polímeros, los nucleótidos se unen entre sí por enlaces éster; el fosfato establece un "puente" desde carbono 5' de la pentosa de un nucleótido al carbono 3' de la pentosa del nucleótido anterior. La primera unidad de la cadena tiene libre su fosfato, mientras la pentosa del último nucleótido tiene libre el hidroxilo de carbono 3'. Se habla así de extremos 5' y 3' de la cadena (fig. 6-8). Esta estructura básica es válida para los dos tipos de ácidos nucleicos.

La notación 5 prima (5') y 3 prima (3'), referida a nucleótidos, indica numeración de carbonos de la pentosa. Para átomos de las bases nitrogenadas se usa directamente el número correspondiente

La existencia de este tipo de enlace entre nucleótidos ha sido confirmada mediante estudios con agentes (álcalis, enzimas) que específicamente escinden un tipo de unión determinado. El

Tabla 6-1. **Nucleósidos y nucleótidos más comunes.**

Base +	*Aldopentosa* =	*Nucleósido* +	*Ácido fosfórico* =	*Nucleótido*	*Abrev.*
Adenina	Ribosa	Adenosina	Ác. fosfórico	Ácido adenílico o adenosina monofosfato	AMP
Adenina	Desoxirribosa	Desoxiadenosina o d-adenosina	Ác. fosfórico	Ácido desoxiadenílico o d-adenosina monofosfato	dAMP
Guanina	Ribosa	Guanosina	Ác. fosfórico	Ácido guanílico o guanosina monofosfato	GMP
Guanina	Desoxirribosa	Desoxiguanosina o d-guanosina	Ác. fosfórico	Ácido desoxiguanílico o d-guanosina monofosfato	dGMP
Timina	Desoxirribosa	Desoxitimidina o d-timidina	Ác. fosfórico	Ácido desoxitimidílico o d-timidina monofosfato	dTMP
Citosina	Ribosa	Citidina	Ác. fosfórico	Ácido citidílico o citidina monofosfato	CMP
Citosina	Desoxirribosa	Desoxicitidina o d-citidina	Ác. fosfórico	Ácido desoxicitidílico o d-citidina monofosfato	dCMP
Uracilo	Ribosa	Uridina	Ác. fosfórico	Ácido uridílico o uridina monofosfato	UMP

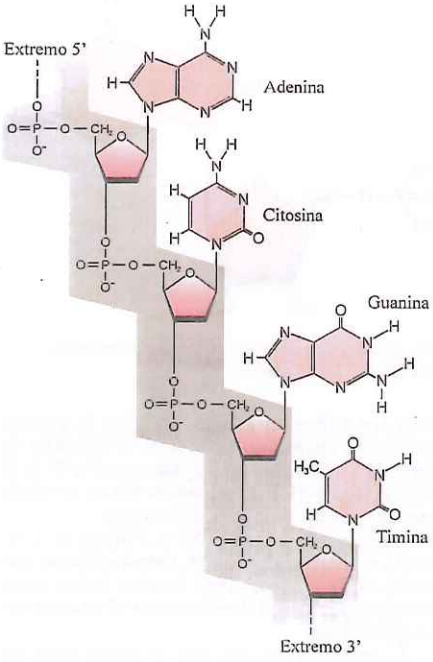


Fig. 6-8. Estructura básica de una cadena polinucleotídica. Sobre fondo gris, fosfatos y pentosas que forman la "columna vertebral" o hebra continua del ácido nucleico.

análisis de los productos resultantes ha permitido establecer la disposición en la cadena.

Según la pentosa integrante de la molécula, se distinguen ácidos desoxirribonucleicos (ADN o DNA) y ribonucleicos (ARN o RNA). Entre estos dos tipos de compuestos existen diferencias estructurales que exigen su consideración por separado.

ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

El ácido desoxirribonucleico se encuentra en su casi totalidad en núcleos celulares; más precisamente, en el material que forma la cromatina. Hay también una pequeña cantidad de ADN en mitocondrias y cloroplastos.

Todas las células somáticas de individuos de una misma especie tienen igual contenido de ADN. En humanos, la cantidad de ADN por célula es de $6 \cdot 10^{-6}$ μg (microgramo) o 6 pg (picogramo). Los gametos masculino y femenino poseen la mitad. Estas cantidades permanecen constantes y no se modifican con la edad ni por factores ambientales o nutricionales.

ADN es una molécula lineal de gran longitud; a veces alcanza a medir centímetros, esto es, magnitudes macroscópicas. En cambio, su eje transversal es de 2 nm; la hebra se corta fácilmente durante los procedimientos de separación y purificación. En la célula se encuentra densamente empaquetada: el cromosoma humano más pequeño, con una longitud de 2 μm, aloja una molécula de ADN de 30 millones kDa y 1,4 cm de largo. Si pudieran colocarse extendidas, una a continuación de otra, las moléculas de ADN de los 46 cromosomas de una célula somática humana, alcanzarían una longitud de casi 2 metros.

Por hidrólisis de ácido desoxirribonucleico se obtienen los nucleótidos constituyentes. La hidrólisis de éstos, a su vez, da lugar a bases púricas y pirimídicas, desoxirribosa y ácido fosfórico. Las bases púricas que participan en la constitución de ADN son *adenina* (A) y *guanina* (G), y las pirimídicas, *timina* (T) y *citosina* (C). En notaciones abreviadas, se acostumbra indicar las bases con la letra inicial de su nombre.

La proporción de bases en ácido nucleico aislado de distintas especies es característica para cada una; sin embargo, existen relaciones fijas entre las bases en todas las muestras de ácido desoxirribonucleico, cualquiera sea su origen. Por ejemplo, el contenido molar de bases púricas es siempre igual al de bases pirimídicas, es decir, la suma de moléculas de adenina más las de guanina es igual a la de timina más citosina (A + G = T + C). Además, las relaciones adenina/timina y guanina/citosina son siempre iguales a la unidad, esto es, el número de moléculas de adenina es igual al de timina (A = T), y el de guanina, al de citosina (G = C).

Observaciones de este tipo, debidas a estudios de Chargaff y el análisis mediante difracción de rayos X realizado por Wilkins y Franklin, sirvieron de base a Watson y Crick para elaborar, en 1953, su modelo molecular del ADN. La descripción adelantada por estos autores recibió amplia aceptación. La estructura del ADN propuesta por Watson y Crick estaba en perfecto acuerdo con hallazgos previos sobre proporciones de bases e imágenes de rayos X; también brindaba un modelo para explicar satisfactoriamente la capacidad de esta molécula de duplicarse durante la división celular y servir de depositaria de información genética.

Estructura molecular de ADN

La molécula de ácido desoxirribonucleico está formada por dos cadenas polinucleotídicas,

enrolladas en hélice alrededor del mismo eje. El ADN es una *doble hélice*.

En cada una de las hélices, la hebra continua está constituida por la sucesión de desoxirribosas y fosfatos tendidos como puentes entre C5' de una pentosa y C3' de la anterior (sector de la molécula sobre fondo gris en la figura 6-8, donde se representa sólo una cadena). En la doble hélice, desoxipentosas y fosfatos, francamente hidrófilos, quedan situados en el exterior de la molécula y toman contacto con el medio acuoso. Las bases púricas y pirimídicas, estructuras planas muy poco polares, escapan del contacto con el solvente y se orientan hacia adentro, en dirección perpendicular al eje central. La figura 6-9, imitada de la original de Watson y Crick, es una representación muy esquemática de la doble hélice. En ella están indicadas como dos cintas las cadenas formadas por desoxirribosas y fosfatos. Los "travesaños" perpendiculares al eje central y dispuestos como peldaños de una escalera de caracol representan las bases púricas y pirimídicas.

Cada vuelta de hélice tiene una extensión de 3,4 nm y cada base está a 0,34 nm de la siguiente, es decir, una vuelta completa de hélice comprende diez bases nitrogenadas (fig. 6-9). El diámetro o sección transversal de la molécula es de 2 nm.

Si pudiéramos mirar la molécula desde cualquiera de sus extremos, comprobaríamos que el enrollamiento se hace en el sentido del giro de las agujas del reloj; la hélice es *derecha* o *dextrógira*.

La cadena polinucleotídica se forma por los "puentes" de fosfato entre carbono 5' de una desoxirribosa y el 3' de la pentosa del nucleótido vecino. En el ADN, las dos cadenas son *antiparalelas*; esto es, ambas siguen una dirección opuesta. Mientras en una de ellas las uniones fosfato van de carbono 5' a carbono 3' de las pentosas, la otra está orientada en sentido opuesto (de carbono 3' a carbono 5'). En cada punta de la molécula se encuentra el extremo 5' de una cadena y el 3' de la otra (fig. 6-10).

La estructura primaria de estas cadenas, es decir, el ordenamiento o secuencia de nucleótidos, es un aspecto de gran importancia en el estudio de ADN. Dadas las enormes dimensiones de la molécula, frecuentemente constituida por cientos de miles a millones de unidades, las posibilidades de formar ordenamientos diferentes con las cuatro bases A, G, T y C son extremadamente grandes.

La información genética está precisamente contenida en la molécula de ADN, "cifrada" o "codificada" en su secuencia de bases. Como se verá más adelante, el ordenamiento de nucleótidos en los trozos de ADN correspondientes a los genes que codifican proteínas, indica la secuencia con la cual habrán de disponerse los aminoácidos para construir la proteína correspondiente.

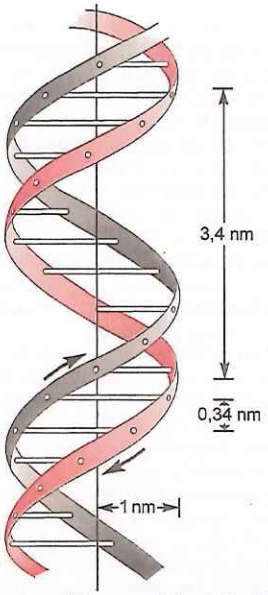


Fig. 6-9. Representación esquemática de la doble hélice de ácido desoxirribonucleico (ADN), según el modelo de Watson y Crick.

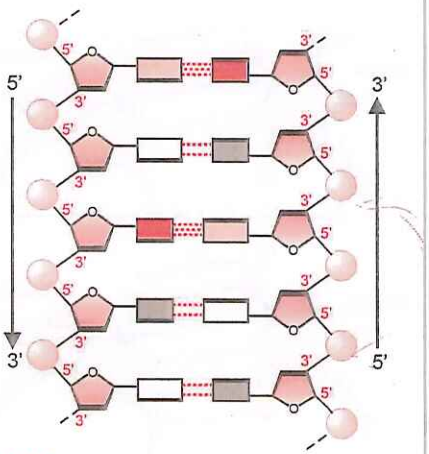


Fig. 6-10. Esquema de un segmento de molécula de ADN en el cual se muestra el apareamiento de las cadenas en la doble hélice. Nótese cómo la orientación de las uniones de fosfatos (esferas rosadas) en una de las cadenas tiene un sentido opuesto al de la otra. Las líneas de puntos rojos representan los enlaces tipo puente de hidrógeno que mantienen apareadas las bases, indicadas como rectángulos: guanina, rosado; citosina, rojo; adenina, blanco y timina, gris.

La secuencia se suele indicar, en forma abreviada, con las iniciales de los nucleósidos constituyentes, por ejemplo, AGCTACT... Así como en las cadenas polipeptídicas los aminoácidos se nombran en el sentido que va desde el extremo N-terminal al C-terminal, en los polinucleótidos las unidades se mencionan comenzando desde el extremo 5'.

Sanger, en Inglaterra, y Maxam y Gilbert, en EE.UU., idearon métodos eficientes y prácticos para determinar la secuencia de bases en ácidos nucleicos. Posteriormente se han empezado a utilizar otros métodos más rápidos y económicos, que han facilitado y acelerado notablemente los estudios de estas sustancias.

Las bases púricas y pirimídicas de cada cadena se dirigen perpendicularmente hacia el eje central, y se aparean en forma definida con los de la otra.

El espacio comprendido entre las dos hélices no permite alojar dos bases púricas a la par, pero resulta demasiado grande para dos bases pirimídicas, que quedarían muy alejadas, sin poder establecer uniones o atracciones entre ellas. En cambio, el espacio o "luz" existente entre las dos hebras es el adecuado para acomodar un par purina-pirimidina. Las bases se unen y mantienen enfrentadas mediante enlaces puente de hidrógeno. Adenina y timina forman dos uniones de hidrógeno al aparearse; guanina y citosina establecen entre sí tres enlaces de hidrógeno (fig. 6-11). Estos

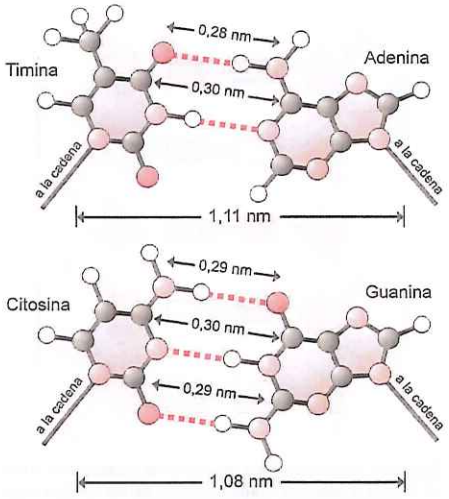


Fig. 6-11. Puentes de hidrógeno (líneas de puntos rojos) entre bases del ADN. Adenina siempre está unida a timina por dos uniones de este tipo. Guanina se enfrenta con citosina, a la cual está ligada por tres puentes de hidrógeno (Watson). C: esferas negras; O: rojas; N: rosadas; H: blancas.

son los únicos apareamientos estables posibles: cada adenina de una de las cadenas está siempre enfrentada por timina de la otra; cada citosina, por guanina.

La doble hélice es una estructura muy estable gracias a los puentes de hidrógeno entre las bases. Estas fuerzas, individualmente débiles, resultan importantes al multiplicarse a lo largo de la molécula, constituida por enorme número de pares de bases.

Otras fuerzas contribuyen, aún más significativamente que los puentes de hidrógeno, al mantenimiento de la doble hélice. Se trata de las interacciones generadas por las fuerzas de van der Waals en los pares de bases apilados en el interior de la molécula.

Si bien la doble hélice es un conjunto compacto, tiene flexibilidad como para arquearse y hasta enrollarse sobre sí misma o sobre otras estructuras. Esta propiedad le permite interaccionar con otras moléculas y también "empaquetarse" en muy pequeños volúmenes.

Es conveniente destacar dos aspectos relacionados con la estructura y función de ADN: a) Las dos cadenas constituyentes de una molécula de ADN no son idénticas, sino *complementarias*; los apareamientos A-T y G-C se producen cuando una cadena posee adenina exactamente frente a timina de la otra y guanina frente a citosina. b) Las cadenas son *antiparalelas*, una marcha en sentido 5'→3' y la otra en dirección 3'→5'. Estos principios de complementariedad y antiparalelismo se aplican en todos los procesos en los cuales estas moléculas participan, como los de duplicación o replicación, transcripción y traducción, procesos que serán descriptos en los capítulos 21 y 22.

El enrollamiento de las dos cadenas de desoxirribosas y fosfatos forma dos surcos o estrías en la superficie de la molécula, paralelas a los giros de la hélice. Uno de ellos es mucho más ancho que el otro (fig. 6-12). En el fondo de esos surcos quedan expuestos átomos componentes de las bases púricas y pirimídicas. Especialmente a nivel del surco mayor, las bases pueden establecer interacciones con proteínas u otras sustancias.

Conformaciones de la doble hélice. La estructura de ADN descripta de acuerdo con la propuesta de Watson y Crick, ampliamente confirmada por estudios posteriores, corresponde a la llamada conformación B, la más común en las condiciones reinantes en la célula (fig. 6-12). Existe otra forma, designada A, más ancha y más corta que la hélice B, tiene 11 pares de bases en lugar de 10 por cada vuelta de hélice, que abarca una longitud de 2,8 nm en vez de 3,4 nm. Desaparece la diferencia entre los surcos, ambos son prácticamente de igual profundidad. Esta forma

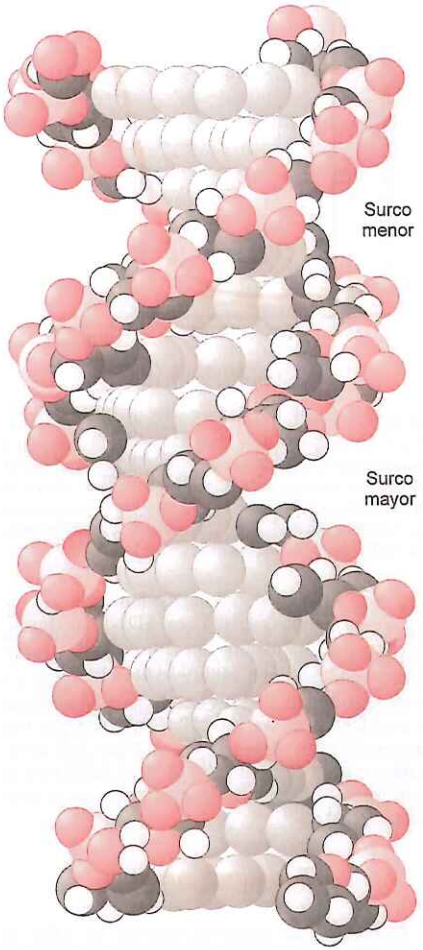


Fig. 6-12. Modelo molecular compacto de ácido desoxirribonucleico (ADN), conformación B. Nótense los surcos mayor y menor paralelos a las espiras de la doble hélice. Los elementos que forman la hebra continua: C, negro; O:, rojo; P, rosado; H, blanco. Elementos de los pares de bases, gris.

no se encuentra en condiciones fisiológicas; se produce cuando el ADN está pobremente hidratado; es característica de dobles hélices de ARN o formadas por ARN y ADN.

La adquisición de métodos para sintetizar cadenas cortas de ADN (oligonucleótidos) permitió estudiar la conformación de dobles hélices con secuencias definidas. Se comprobó que cadenas formadas por sucesión alternada de guaninas y citosinas (GCGC...) adoptan una conformación muy diferente de la B, a la cual se la llamó Z. La doble hélice cambia el sentido de su enrollamiento, se hace levógira en lugar de dextrógira; el surco menor es más profundo y el mayor prácticamente desaparece (fig. 6-13). La molécula es

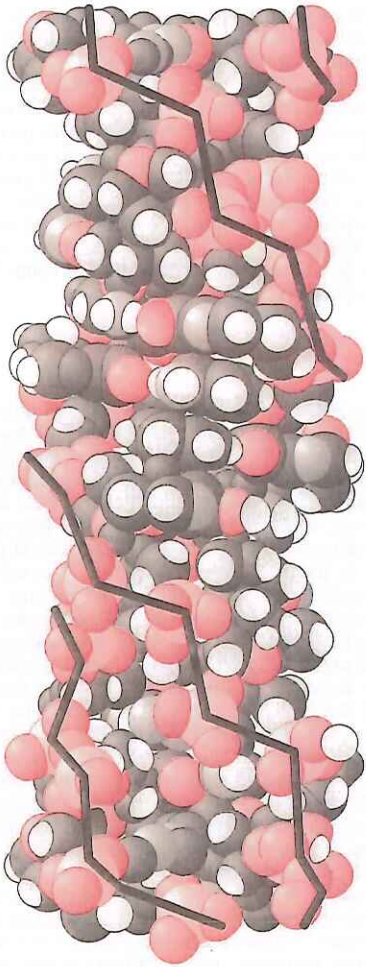


Fig. 6-13. Modelo molecular espacial compacto de ADN conformación Z. La molécula es más delgada y elongada que en la forma B; el sentido del giro es hacia la izquierda (levógiro) y la cadena sigue una línea quebrada, en zigzag. C: negro; O: rojo; N: gris; P: rosado.

más delgada y elongada y presenta 12 pares de bases por vuelta. La cadena de desoxirribosas y fosfatos dibuja una línea en zigzag (de allí el nombre Z), no directa como en la forma B. Aún no se conoce si el ADN Z tiene algún papel funcional. De cualquier manera, los estudios en moléculas sintéticas han puesto de manifiesto que determinadas secuencias de nucleótidos admiten cambios en la conformación de la doble hélice y pueden llegar a alterar el acceso a las bases ubicadas en el fondo de los surcos, modificando la amplitud y profundidad de éstos. El fenómeno quizás tenga significación. La actividad del ADN es modulada por proteínas que se unen a él en sitios precisos. Cambios conformacionales podrían favorecer o dificultar la fijación de esas proteínas reguladoras. Igual significación tendría la presencia de bases metiladas en ciertos sectores de la doble hélice. La molécula de ADN no sólo almacena información genética; también posee, como parte de su estructura, señales para el control de su propia actividad.

Desnaturalización de ADN

La doble hélice se mantiene por las uniones puente de hidrógeno entre pares de bases y por interacciones de las bases apiladas en el interior de la molécula, que le dan una estructura compacta.

Diversos agentes (calentamiento, álcalis fuertes, urea, formamida) debilitan dichas fuerzas y promueven la separación de las cadenas; el proceso es llamado *desnaturalización*. Las hebras polinucleotídicas desenrolladas tienen una estructura flexible y adoptan disposición al azar.

La desnaturalización de ADN en solución puede ser seguida espectrofotométricamente, midiendo la absorción de luz ultravioleta a 260 nm; el ADN al estado nativo absorbe menos que las dos cadenas separadas, fenómeno llamado *hipocromicidad*. Si se somete la dispersión a calentamiento lento, se registra la absorción de luz ultravioleta (a 260 nm) a distintas temperaturas, y se representan los resultados en un sistema de coordenadas, se obtiene una curva sigmoide (fig. 6-14). A medida que aumenta la temperatura, se produce incremento de absorción (efecto hipercrómico). Cuando se llega al máximo de desnaturalización, la densidad óptica no aumenta más con el calentamiento, indicando que las cadenas se han separado totalmente.

La temperatura a la cual la mitad del ADN está desnaturalizado (correspondiente al punto medio o de inflexión de la curva), es la temperatura de fusión o *Tm*. El valor es característico

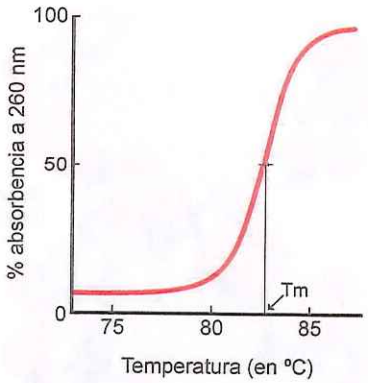


Fig. 6-14. Curva de desnaturalización del ADN. Se determina la variación de absorbencia a 260 nm al aumentar la temperatura (efecto hipercrómico). Cuando se ha producido separación completa de las dos hélices, la absorbencia no aumenta más aunque se incremente la temperatura. Tm: temperatura de fusión, corresponde a la temperatura a la cual se ha desnaturalizado 50% del ADN.

para cada ADN en condiciones definidas de concentración salina y pH. Para ADN aislados de distintos organismos, oscila entre 80°C y 100°C. La determinación del valor de Tm es útil para conocer aproximadamente la composición en bases de un ADN. Como el par G-C está unido por tres puentes de hidrógeno y el par A-T por dos, cuanto mayor es el contenido de G-C, el ADN es más resistente a la desnaturalización y mayor su temperatura de fusión.

Renaturalización

El proceso de desnaturalización de ADN es reversible en condiciones controladas de pH y concentración iónica. Si se disminuye lentamente la temperatura en la solución donde el ADN se había desenrollado completamente, se produce reasociación de las cadenas y se restablece la estructura original de doble hélice. Este proceso se puede seguir espectrofotométricamente a 260 nm y obtener una curva que es prácticamente la inversa de la de desnaturalización. La renaturalización por enfriamiento lento se llama *templado* del ADN (en la literatura inglesa se utiliza el término *reannealing*). Al encontrarse cadenas complementarias, reconstituyen la doble hélice.

La velocidad de renaturalización tiene interés por su relación con aspectos de la estructura del ADN en las células.

Si en un determinado ADN existen muchas zonas de igual secuencia (*secuencias repetitivas*), el tiempo de templado es menor, pues es más fácil para una cadena dada encontrar un trozo complementario con el cual reasociarse. En cambio, segmentos cuya secuencia es única en todo el ADN de una célula necesitarán un tiempo prolongado para alcanzar su cadena complementaria y volver a formar la doble hélice.

En preparaciones de ADN de mamíferos se puede demostrar la presencia de fragmentos repetidos muchas veces. Es el llamado ADN *altamente repetitivo*, del cual pueden existir cientos de miles a millones de copias. Estos segmentos se reasocian rápidamente después de la desnaturalización, pues existen muchas posibilidades de encuentro de dos trozos complementarios. Las porciones de ADN altamente repetitivo de más de seis pares de bases de longitud son designadas también ADN *satélite*. En los cromosomas se las ha localizado en sitios próximos al centrómero y en los extremos o telómeros. Es frecuente encontrar repeticiones en tándem de uno a seis nucleótidos; son los llamados *microsatélites*. Otra parte del ADN está representada por trozos *moderadamente repetitivos*, que comprenden secuencias presentes entre cientos y miles de copias en el ADN total; éstos se reasocian con menor velocidad que el anterior. Una tercera fracción, que en mamíferos comprende alrededor del 60% del ADN total, corresponde a secuencias que sólo se encuentran en una a tres copias, razón por la cual se reasocian muy lentamente. En general, se acostumbra llamarla ADN *de copia única*. En bacterias, prácticamente la totalidad del ADN es de copia única.

Hibridación. Si se mezclan, en condiciones adecuadas, ADN desnaturalizado de dos organismos diferentes, algunos segmentos pueden tener trozos complementarios que forman dobles hélices "híbridas" (una cadena de cada uno de los organismos). Este tipo de hibridación de ADN permite estudiar la proximidad o distancia evolutiva entre dos especies diferentes. ADN desnaturalizados pertenecientes a seres filogenéticamente próximos, formarán moléculas híbridas en mayor proporción que los muy apartados. Por ejemplo, el ADN humano forma dobles hélices híbridas en mayor proporción con ADN de mono rhesus que con ADN de ratón.

Cromatina

El ADN nuclear de células de eucariotas (poseen núcleo rodeado por una membrana) se encuentra en los cromosomas, cada uno de los cuales aloja una molécula de ADN (dos moléculas inmediatamente después de la replicación, cuando se forman las *cromátidas hermanas*). Estas enormes moléculas están densamente "empaquetadas" en los complejos nucleoproteicos que forman la *cromatina*. La organización de ésta experimenta cambios durante el ciclo celular. En la interfase, en el núcleo sólo se detecta un retículo irregular de cromatina extendida y no se visualizan cromosomas. Al iniciarse la mitosis, más precisamente al final de la profase, la cromatina se condensa en formaciones discretas, los cromosomas, que alcanzan máxima densidad en la metafase.

Las nucleoproteínas que forman la cromatina tienen ADN y una variedad de proteínas nucleares. Las más abundantes de estas proteínas son las *histonas*, de carácter básico. Más del 20% de los aminoácidos constituyentes de las histonas está representado por lisina y arginina. Los grupos libres ionizables de estos aminoácidos tienen carga positiva, que establece atracciones electrostáticas con grupos negativos de fosfatos de las cadenas de ADN. Se trata de interacciones de moléculas policatiónicas con moléculas polianiónicas. Se han aislado cinco tipos diferentes de histonas en el núcleo, denominados HI, H2a, H2b, H3 y H4, cuya masa molecular oscila entre 11 y 21 kDa. Sólo se encuentran en células de eucariotas.

Las otras proteínas asociadas a ADN constituyen un conjunto heterogéneo en el cual se incluyen polipéptidos con funciones estructurales, como el grupo de proteínas de alta movilidad (HMG, de *high-mobility group*), proteínas regulatorias de la actividad génica (ej.: *Fos, Myc*) y las enzimas necesarias para la síntesis y procesamiento de ácidos nucleicos en el núcleo (por ej., ADN y ARN polimerasas).

Estudios con difracción de rayos X y microscopia electrónica han permitido describir la disposición de la cromatina y explicar cómo la enorme molécula de ADN se "empaqueta" en cromosomas (en promedio, se calcula que cada cromosoma humano aloja una doble hélice de ADN de 4 cm de longitud).

A intervalos regulares, la molécula de ADN da dos vueltas sobre un núcleo constituido por un octámero de histonas H2a, H2b, H3 y H4 (dos unidades de cada una). Este tipo de estructura, en la cual una hélice se enrolla a su vez sobre un eje, se llama *superhélice*.

Las vueltas de superhélice sobre el "carretel" formado por las histonas abarcan una longitud de 146 pares de bases. El núcleo de histonas y la superhélice constituyen una partícula llamada nucleosoma (fig. 6-15). Una unidad de histona H1 está asociada a la doble hélice de ADN en el lugar de su entrada y salida del nucleosoma. El

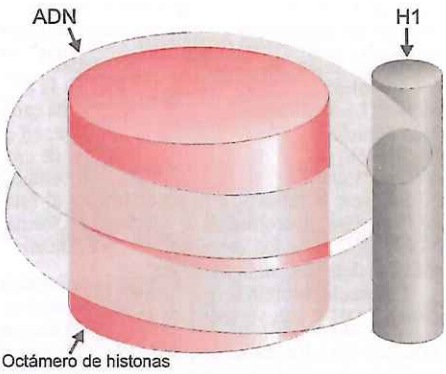


Fig. 6-15. Representación esquemática de un nucleosoma. La doble hélice de ADN se enrolla en una superhélice de dos vueltas sobre un núcleo constituido por un octámero de histonas (cilindro central). El cilindro más delgado a la derecha, en el lugar donde la doble hélice entra y sale del nucleosoma, es histona H1.

conjunto de nucleosomas y H1 recibe el nombre de *cromatosoma*. El ADN, después de dar dos vueltas sobre las histonas, se extiende en un trozo de unos 50 a 60 pares de bases (ADN espaciador) antes de volver a formar una superhélice alrededor de otro octámero de histonas y así sucesivamente. Este segmento de ADN "libre" entre nucleosomas adyacentes puede ser más corto, a veces sólo de 8 pares de bases. El conjunto de nucleosomas es visible al microscopio electrónico y aparece como cuentas de rosario enlazadas por la hebra de ADN. Esta ristra de nucleosomas, de 10 nm de sección, se presenta extendida durante la interfase. En el momento de iniciación de la mitosis, se produce la condensación. Se ha propuesto que la serie de cromatosomas se enrolla en "solenoide" de seis unidades por vuelta (fig. 6-16), que forma una fibra de 30 nm de sección transversal. Probablemente las histonas H1 juegan un papel en esta condensación, pues quedan todas ubicadas en la parte interior, formando el centro del solenoide. La larga fibra con los nucleosomas densamente agrupados en solenoide, a su vez se pliega en asas o bucles. Para los cromosomas mitóticos, esta estructura sería mantenida por uniones cruzadas en la cromatina.

La imagen que comúnmente se tiene de los cromosomas es la de su forma más condensada, en metafase. Las dos cromátidas hermanas resultantes de la duplicación se unen a nivel del *centrómero*, sitio donde se ensambla el *cinetocoro*, complejo proteico al cual se unen los microtúbulos del huso mitótico. Los microtúbulos separan las cromátidas en la anafase. El ADN del centrómero en la levadura tiene una secuencia rica en A-T de 88 pares de bases de longitud, flanqueada por dos regiones conservadas cortas. En células de mamíferos, esta secuencia es más larga y está flanqueada por gran cantidad de ADN repetido, el ADN *satélite*. Los extremos del cromosoma son los *telómeros*, correspondientes a los terminales 5' y 3' de la molécula de ADN. En ellos se encuentran cientos de secuencias cortas repetidas (TTAGGG). Su función es proteger de la degradación los extremos de los cromosomas.

Durante la interfase, los cromosomas adoptan una estructura difusa; sin embargo, parte de la cromatina permanece condensada, visible al microscopio en la periferia del núcleo. Se trata de porciones inactivas de ADN y recibe el nombre de *heterocromatina*. Generalmente contiene ADN con secuencias repetidas miles de veces (satélites) o modificado covalentemente (metilación de citosinas). La mayor parte de la heterocromatina se encuentra cerca de los centrómeros y telómeros.

En las células de hembras de mamíferos, uno de los cromosomas X permanece en su totalidad como

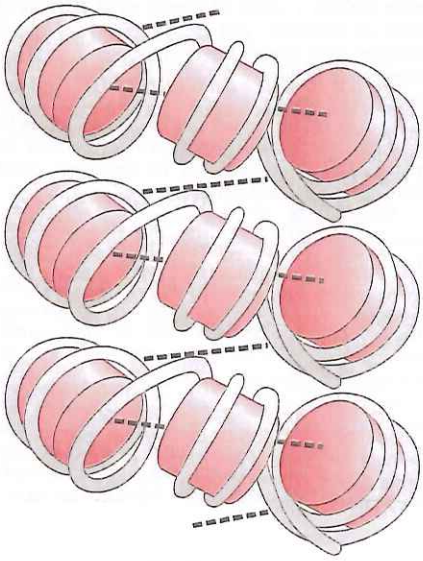


Fig. 6-16. Empaquetamiento de ADN. Los nucleosomas se disponen en solenoide, enrollándose sobre un eje central; cada vuelta comprende seis nucleosomas. La línea de trazos indica el sentido del enrollamiento. Se han representado sólo los cromatosomas situados al frente y no los de atrás.

heterocromatina (corpúsculo de Barr). El resto de la cromatina, no detectable como heterocromatina, es denominada *eucromatina*. Si bien no hay pruebas concluyentes al respecto, se acepta generalmente que la eucromatina comprende las regiones de ADN "activo", suficientemente extendidas como para permitir la transcripción (pág. 424).

ADN circular

Bacterias. La información genética de organismos procariotas (sin núcleo) como las bacterias, se encuentra en un cromosoma único constituido por una doble hélice de ADN que no tiene extremos libres; la molécula se cierra sobre sí misma formando un círculo. Al parecer, el ADN bacteriano no está organizado en nucleosomas, aunque es común observar acúmulos compactos de material genético. Inicialmente se pensó que no estaba asociado a proteínas y se lo consideraba un ADN "desnudo". Sin embargo, se han aislado varias proteínas de pequeña masa, semejantes a las histonas, con capacidad para formar complejos con ADN de bacterias.

Para dar una idea del tamaño del ADN bacteriano, se referirán algunos datos del cromosoma de *Escherichia coli*, bacteria de la flora intestinal, cuyo ADN ha sido intensamente estudiado. El cromosoma de *E. coli* tiene unos 4 millones de pares de bases o 4.000 kilobases (para simplificar, se usa corrientemente el múltiplo kilobase, que corresponde a mil pares de bases). El peso promedio de un par de nucleótidos es 660 Da, la molécula tiene una masa de $2{,}6 \cdot 10^9$ Da; su longitud es 1,36 mm, notablemente menor que el de cromosomas de animales superiores.

Si el anillo se extiende sobre un plano, formando un círculo (fig. 6-17 A), se dice que el ADN está "relajado". Es más común encontrarlo enrollado sobre sí mismo, en superhélices (fig. 6-17 B). La existencia de enzimas especiales que catalizan superenrollamientos y la energía invertida en estos procesos, indican que deben tener importancia funcional.

Plásmidos. Además de un cromosoma en el cual se almacena la casi totalidad de la información genética, muchas bacterias poseen otras moléculas de ADN circular, de pequeño tamaño (de 2 a 200 kilobases), que se duplican independientemente y contienen información genética accesoria. Estas pequeñas moléculas de ADN extracromosomal son llamadas *plásmidos*. Comúnmente los genes responsables de la resistencia a antibióticos están contenidos en estos plásmidos. Pueden ser transferidos de una bacteria a otra a través de las paredes

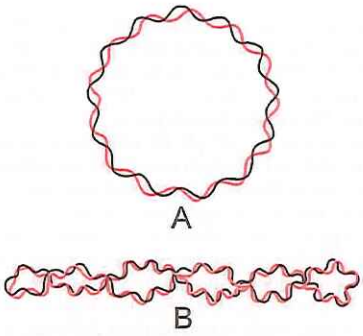


Fig. 6-17. ADN circular bacteriano. A. ADN circular "relajado". B. el mismo ADN circular enrollado sobre sí mismo en superhélice.

celulares, razón por la cual los genes incluidos en ellos se han difundido ampliamente.

Existen técnicas que permiten separar plásmidos de una preparación de bacterias y obtenerlos puros, libres de ADN cromosomal.

Mitocondrias. En mitocondrias y cloroplastos se ha aislado ADN con características semejantes a las del cromosoma de bacterias, aunque de tamaño menor. Es un ADN circular constituido por unos 15.000 pares de bases (15 kilobases). El de mitocondrias humanas posee 16.569 pares de bases, cuya secuencia contiene información para la síntesis de ARN y de algunas proteínas propias de la organela.

La mitocondria no es autosuficiente desde el punto de vista genético, ya que la mayor parte de sus proteínas son sintetizadas por la célula con información contenida en ADN nuclear.

La existencia de este ADN mitocondrial, con características similares al de bacterias, es una evidencia a favor de la hipótesis que postula a la mitocondria como el estado evolutivo actual de una bacteria en relación endosimbiótica con la célula.

Genoma

Todos los individuos de una especie tienen la misma cantidad de ADN en cada una de sus células. En organismos diploides con reproducción sexual, las células somáticas contienen el doble del existente en células gaméticas (haploides). La totalidad de ADN en cada célula es denominado *genoma*; éste representa el "capital genético" característico del individuo.

El tamaño del genoma guarda relación con la complejidad del organismo, pero esta relación no

es simple. Por ejemplo, la bacteria *Escherichia coli* contiene en su cromosoma único algo más de 4 millones ($4 \cdot 10^6$) de pares de bases (pb); la levadura *Sacharomices cerivisiae*, $1{,}4 \cdot 10^7$ pb; la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, $1{,}7 \cdot 10^8$ pb; el *Homo sapiens*, $6 \cdot 10^9$ pb. El aumento en la cantidad de ADN por célula en eucariotas con respecto a procariotas es mucho mayor que el esperado según las necesidades del incremento de información y complejidad. Entre eucariotas se observan algunos hechos llamativos: existen especies de peces y anfibios cuyos genomas son mucho más grandes (hasta 10^{11} pb) que los de mamíferos. El ADN en exceso del esperado según la complejidad del individuo se debe a la existencia de extensas porciones del genoma originariamente consideradas como funcionalmente inactivas, sin información genética. Evidencias recientes sugieren que, al menos parte de este ADN "inactivo", cumpliría importantes roles.

El genoma o contenido total de ADN de una célula haploide humana (espermatozoide u óvulo) está distribuido en 23 cromosomas, 22 autosómicos y uno sexual (X o Y) y comprende 3 mil millones de pares de bases. Las células diploides tienen un total de 46 cromosomas; cada uno de los 22 cromosomas autosómicos tiene un homólogo. Las moléculas de ADN de cromosomas homólogos son similares, pero no necesariamente idénticas. Un cromosoma de cada par procede del padre y el otro de la madre. Cada célula diploide tiene además dos cromosomas sexuales; en la mujer dos X y en el hombre, un X y un Y.

ÁCIDO RIBONUCLEICO

El ácido ribonucleico es un polinucleótido cuyas principales diferencias estructurales con ADN son: a) El azúcar presente es D-ribosa en lugar de D-2-desoxirribosa. b) En el ácido ribonucleico no existe la base pirimídica timina; en cambio, se encuentra *uracilo*. Las bases restantes son las mismas presentes en ADN (adenina, guanina y citosina). c) La molécula de ARN está formada por una cadena polinucleotídica, no dos como en ADN. Sin embargo, comúnmente la cadena de ARN se dobla en horquilla y se enrolla sobre sí misma, en trozos que remedan la doble hélice de cadenas antiparalelas. Para ello, por supuesto, deben existir segmentos complementarios.

Si bien la constitución química del ARN no difiere mucho de la de ADN, existe gran disparidad en cuanto a propiedades funcionales. La molécula de ARN tiene mayor flexibilidad conformacional y capacidad para ejercer diversas funciones (ver pág. 447).

Como la molécula posee sólo una cadena, no es requisito que se cumplan las relaciones molares entre purinas y pirimidinas observadas en ADN. La cantidad de guaninas no es necesariamente igual a la de citosinas, ni la de adeninas a la de uracilos.

En las células existen varios tipos de ácido ribonucleico: mensajero (ARNm), ribosómico (ARNr), de transferencia (ARNt), ARN nuclear pequeño, micro ARN y otros.

Ácido ribonucleico mensajero (ARNm)

Representa aproximadamente 5% del total de ácido ribonucleico de la célula. Se lo encuentra distribuido en el núcleo y citoplasma. La masa molecular y composición en bases son muy variables.

Su papel fisiológico es transmitir información genética desde ADN nuclear hacia el sistema de síntesis de proteínas en citoplasma y servir de guía para el ensamble de aminoácidos en el orden correcto.

El ARN nuclear es muy heterogéneo y alcanza gran tamaño, su masa es a veces más de 10^6 Da. Las grandes moléculas sintetizadas en el núcleo son sometidas a un proceso designado *splicing* en la literatura inglesa (las cadenas originales son seccionadas en trozos, algunos de los cuales vuelven nuevamente a unirse y terminan formando las hebras de ARNm que pasan al citoplasma). Aproximadamente 20% del ARN original es utilizado para formar ARNm; el resto es degradado. El llamado *ARN nuclear heterogéneo* (ARNnh) incluye las grandes moléculas precursoras de ARNm, las intermediarias del *splicing* y las de los productos finales del procesamiento, los ARNm "maduros", de longitud mucho menor que la del precursor. El ARNnh se asocia a proteínas para formar ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (RNPnh).

Los ARNm procesados son modificados en ambos extremos, al 5' terminal se le une 7-metilguanosina trifosfato. Este nucleósido trifosforado serviría como "marcador" para el reconocimiento del ARNm por parte del sistema de síntesis de proteínas; también contribuye a la estabilidad del ARNm, protegiendo el extremo 5' de la acción de enzimas hidrolíticas. El extremo 3' terminal fija un polímero constituido por 100 a 250 unidades de ácido adenílico o AMP, al cual se lo llama *poli-A*. Al parecer, esta "cola" de poli-A otorga estabilidad al ARNm. El ARNm es el más lábil de los ácidos ribonucleicos, su vida media en células de mamíferos es de unas 6 horas. El de bacterias es aún de más corta duración.

Si se mezclan en condiciones adecuadas ADN desnaturalizado y ARN, pueden producirse aso-

ciaciones en doble hélice si existen en las cadenas secuencias complementarias. Se produciría hibridación ADN-ARN, con apareamientos G-C, A-U y T-A.

Ácido ribonucleico de transferencia (ARNt)

Este tipo de ARN, también llamado soluble, es el de menor tamaño molecular; su masa es de unos 25 kDa; su cadena contiene alrededor de 75 nucleótidos.

El ARNt participa en la síntesis de proteínas transportando aminoácidos libres del citosol hasta el lugar de ensamble. Actúa como molécula adaptadora, que asegura la ubicación de cada aminoácido en el sitio correspondiente. En cada célula existen distintas especies de ARNt, específicos para cada uno de los aminoácidos. Se conoce la secuencia de nucleótidos o estructura primaria de ARNt aislados de diferentes organismos. En estas moléculas es relativamente frecuente la presencia de nucleósidos distintos de A, U, G y C, como dihidrouridina, seudouridina, inosina y derivados metilados o dimetilados de A, U, G y C.

Los primeros estudios indicaron que la molécula de ARNt semeja, en su disposición general, una hoja trilobulada (fig. 6-18). La cadena polinucleotídica posee segmentos complementarios que se aparean antiparalelamente. Aproximadamente la mitad de los residuos constituyentes del ARNt están enfrentados en cuatro zonas de doble hélice. Existen también porciones desplegadas de la cadena; son los lóbulos o "asas" de la molécula. El asa central contiene un grupo de tres bases, el *anticodón*, responsable de la especificidad de aminoácido y de la función de adaptador. El conjunto de esta "hoja de trébol" posee un tallo (uno de los segmentos en doble hélice), en cuyo extremo se encuentran los terminales 5' y 3' de la molécula. En el extremo 5' existe un resto guanosina (G) o citidina (C). En el 3', todos los ARNt presentan la secuencia CCA para los tres últimos nucleótidos. El aminoácido se une por enlace tipo éster entre el carboxilo del aminoácido y el –OH de carbono 3' de ribosa de la última adenosina. Debido a esta función de fijar el aminoácido, el tallo es llamado *brazo aceptor*. Hay también un brazo extra, indicado en la figura como lóbulo adicional, cuya extensión varía en distintos ARNt.

Modelos posteriores, construidos según resultados de estudios por difracción de rayos X, demostraron que la molécula tiene, en conjunto, forma de L (fig. 6-19). El sitio aceptor del ami-

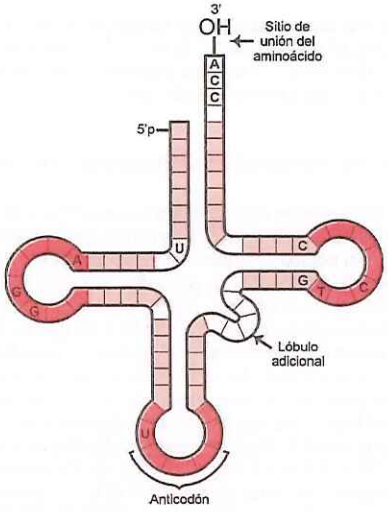


Fig. 6-18. Representación esquemática de una molécula de ARNt. En rojo se muestran las tres asas o lóbulos. Los trozos en los cuales hay apareamiento de la cadena corresponden a los cuatro segmentos de doble hélice (en rosado). El Terminal 3' posee la secuencia CCA; a este extremo se une el aminoácido transportado por el ARNt. Las bases señaladas con letras son invariables en todos los ARNt.

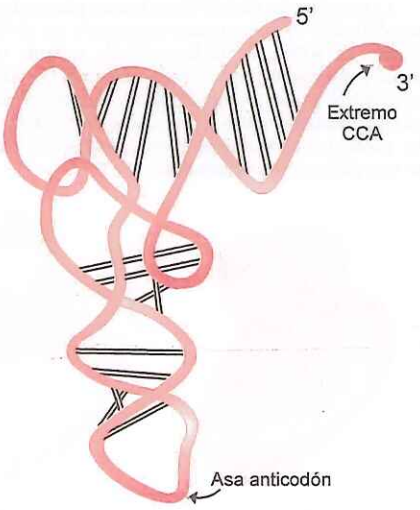


Fig. 6-19. Esquema de la disposición tridimensional del ARNt.

noácido está en uno de los extremos de la L y en el otro, el asa anticodón. Si bien esta estructura es más fidedigna, el esquema trilobular sigue siendo útil para representar la molécula.

Ácido ribonucleico ribosomal (ARNr)

Es la especie más abundante; constituye aproximadamente 80% del ARN contenido en la célula.

Es el núcleo prostético de nucleoproteínas componentes de *ribosomas*, pequeños gránulos localizados en el citoplasma, libres o unidos a retículo endoplasmático rugoso. Más de 55% de la masa del ribosoma corresponde a ARN; el resto, a proteínas.

Los ribosomas de organismos eucariotas tienen coeficiente de sedimentación de 80 S (unidades Svedberg); están constituidos por dos partículas: la mayor, de 60 S, integrada por 3 moléculas de ARN (de 28 S, 5,8 S y 5 S) y alrededor de 45 proteínas diferentes. Su masa es de 2.700 kDa. La partícula menor tiene una molécula de ARN (de 18 S) y unas 30 proteínas; su coeficiente de sedimentación es de 40 S y la masa, 1.300 kDa. Las bacterias poseen ribosomas de 70 S con una partícula mayor de 50 S y una menor de 30 S (los valores no son aditivos porque S depende no sólo del tamaño, sino también de la forma). Aunque hay muchas más moléculas de proteínas que de ARN, como éstas son de mayor tamaño, representan más de dos tercios de la masa total del ribosoma.

Las moléculas de ARNr presentan plegamientos definidos y numerosos segmentos en doble hélice. El ARNr de cada partícula cumple un papel importante, tanto desde el punto de vista estructural como funcional. Si se agregan en un medio adecuado todas las moléculas de ARNr y las proteínas constituyentes de la partícula, ésta se ensambla espontáneamente.

Se ha confeccionado un modelo tridimensional de ribosomas; ambas partículas componentes del ribosoma poseen una forma irregular (fig. 6-20).

Al microscopio electrónico es posible detectar conjuntos formados por varios ribosomas unidos a una hebra de ARNm como cuentas de un rosario; esos conjuntos son denominados *polisomas*.

Otros ácidos ribonucleicos

Otras partículas con ARN existentes en las células integran las *ribonucleoproteínas nucleares pequeñas* (la notación en inglés es snRNP; también se las llama *snurps*). El ARN de snRNP tiene menos de 300 restos nucleotídicos; es rico en uracilo, razón por la cual se designan anteponiendo la letra U a las siglas (UsnRNP). Se han aislado varias especies de estas partículas, que se distinguen con un número a continuación de la U (U1, U2, U6). Las snRNP intervienen en el procesamiento de ARNm en el núcleo. Existen también *ribonucleoproteínas citosólicas pequeñas* (scRNP).

Los microRNA son otro importante grupo de moléculas con funciones regulatorias.

VIRUS

Los virus son partículas formadas por ácidos nucleicos rodeados de proteína, con capacidad para reproducirse a expensas de las células que invaden. Son agentes de numerosas enfermedades, tanto en animales como en vegetales. Algunos de ellos producen desarrollo de tumores en el organismo hospedador. Existen virus, llamados *bacteriófagos*, que atacan a bacterias.

Básicamente están constituidos por una cubierta de naturaleza proteínica llamada *cápsida*, con

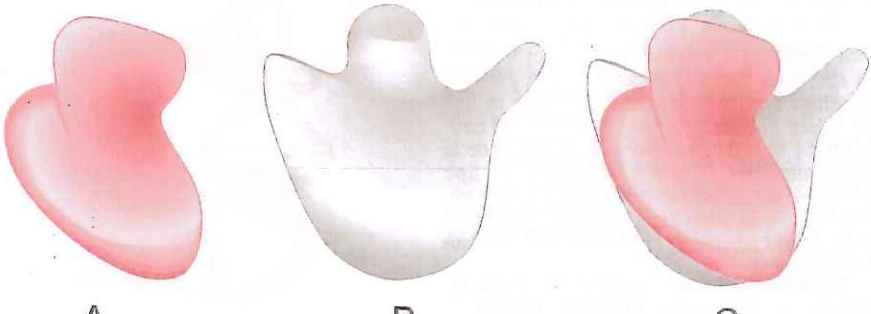


Fig. 6-20. Ribosoma. A. Partícula menor; B. Partícula mayor. C. Ensamble de las dos partículas para formar el ribosoma.

ácido nucleico en su interior. La cápsida se forma por asociación de unidades polipeptídicas o *capsómeros*, dispuestos regularmente en forma simétrica. Gracias a esta disposición, los virus presentan por lo general conformaciones geométricas, a veces poliédricas, otras cilíndricas. En los virus más simples, la cubierta está formada por un solo tipo de unidades polipeptídicas; en los más complejos, existen distintas clases de unidades, e incluso suelen asociarse a ellas lípidos o hidratos de carbono.

En el interior de la cápsida, protegido por ella, se aloja el material genético del virus, constituido por ADN o ARN. Se utiliza el término *virión* para designar a la forma completa de un virus, consistente de ADN o ARN rodeado por una cubierta. A diferencia de los organismos pro- y eucariotas, en los cuales se encuentran los dos tipos de ácido nucleico, en los virus sólo existe uno de ellos. Los virus que atacan a células animales pueden contener ADN o ARN. Estas moléculas son de una sola hebra en algunos casos, o presentan estructura de doble hélice en otros. Por su pequeño tamaño relativo, es más fácil aislar moléculas de ADN intactas en virus que en organismos más complejos. Esto ha impulsado su utilización como prototipos en numerosos estudios de su estructura y función. Uno de los virus más pequeños es el bacteriófago ϕX174, con una sola hebra compuesta por 5.386 nucleótidos. Esta molécula de ADN fue la primera en la cual se determinó íntegramente la secuencia de bases.

En la figura 6-21 se muestra la estructura de un virus de vegetales, el del mosaico del tabaco. Tiene una cadena de ARN enrollada en hélice, cubierta por múltiples unidades polipeptídicas; el

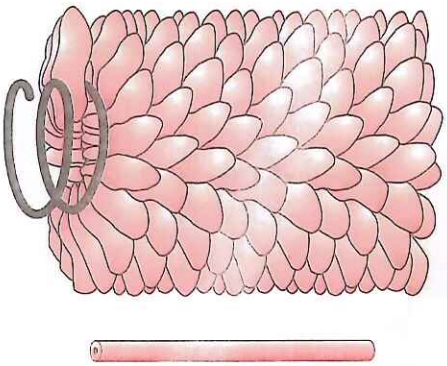


Fig. 6-21. Virus del mosaico del tabaco. Se representa esquemáticamente la hélice de ARN en el interior (espiral en negro) y unidades polipeptídicas de cubierta. La figura inferior muestra un virus completo con su forma de bastoncillo cilíndrico.

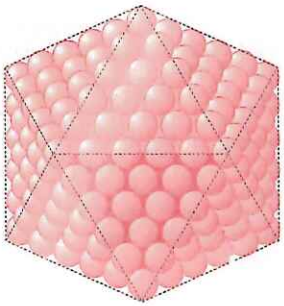


Fig. 6-22. Adenovirus (simetría icosaédrica).

conjunto es un bastoncito cilíndrico. El ARN de este virus posee 6.400 nucleótidos y la cápsida está compuesta por 2.130 unidades iguales, dispuestas helicoidalmente.

La figura 6-22 presenta un esquema de *adenovirus*, cuya cubierta está formada por 252 capsómeros dispuestos según la simetría de icosaedro. En el interior de esta cubierta se encuentra ADN de doble hélice.

Los bacteriófagos serie T poseen estructura más compleja. Las proteínas de cubierta forman una "cabeza" poliédrica dentro de la cual está contenido el ADN con la información genética del virus. Además tienen un tallo hueco formado por proteínas con capacidad contráctil y seis filamentos en su base que le permiten fijarse a la pared de la bacteria atacada (fig. 6-23).

El ácido nucleico encerrado en la cápsida contiene la información necesaria para sintetizar las proteínas del virus. Estos se multiplican invadiendo una célula en la cual introducen su ácido nucleico y la obligan a reproducir nuevas partí-

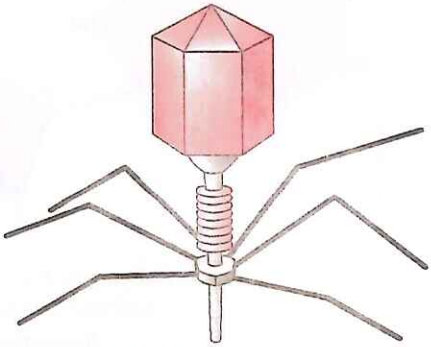


Fig. 6-23. Bacteriófago T4.

culas virales. Se comportan como parásitos perfectos, que utilizan la maquinaria metabólica y la energía de las células invadidas para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos del propio virus.

Viroides. Son agentes infecciosos que causan enfermedades en vegetales. A diferencia de los virus, en los cuales el genoma está protegido por una cubierta proteica, el viroide es sólo ácido nucleico. Están constituidos por una molécula circular de ARN de hebra única, de alrededor de 300 nucleótidos.

NUCLEÓTIDOS LIBRES

Existen sustancias de tipo nucleotídico con funciones muy importantes, no como constituyentes de ácidos nucleicos, sino libres o integrando moléculas de tamaño relativamente pequeño.

En esta categoría se encuentran nucleósidos difosforados y trifosforados, derivados de los ribonucleótidos de la tabla 6-1 por adición de uno o dos restos de ácido fosfórico. El más abundante en el organismo es *adenosina trifosfato* (*ATP*). Este compuesto es el más importante mediador en reacciones de transferencia de grupos fosforilo acompañadas por notables cambios de energía. La hidrólisis de los enlaces entre el segundo (β) y tercer (γ) fosfato y entre el primero (α) y segundo, tiene un ΔG francamente negativo, razón por la cual se dice que el ATP es un compuesto "rico en energía" (ver pág. 139). Al hidrolizarse la unión entre los fosfatos segundo y tercero, el ATP se convierte en adenosina difosfato (ADP). Si éste pierde otro resto fosforilo, se obtiene adenosina monofosfato (AMP) (fig. 6-24).

El guanosina trifosfato (GTP) es otro nucleótido que participa en procesos muy importantes. CTP y UTP también intervienen en reacciones de transferencia de grupo fosforilo.

Tanto ribonucleósidos como desoxirribonucleósidos trifosforados son compuestos básicos necesarios para la síntesis de ARN y ADN respectivamente.

En el organismo, nucleósidos mono y difosforados son convertidos en trifosforados por procesos de captación de la energía liberada durante la oxidación de combustibles ingresados con los alimentos (fosforilación oxidativa) o por transferencia de energía a partir de intermediarios metabólicos ricos en ella (fosforilación a nivel de sustrato) (ver págs. 176 y 186).

Entre los nucleósidos difosforados hay varios que participan en reacciones de transferencia de moléculas utilizadas en procesos de síntesis o conjugación. Por ejemplo, uridina difosfatoglucosa (UDPGlc), uridina difosfatogalactosa (UPD Gal) y uridina difosfato-glucurónico (UDPGlu) actúan como importantes intermediarios en el metabolismo. Citidina difosfatocolina (CDPcolina) transfiere colina para síntesis de fosfolípidos y fosfoadenosina fosfosulfato (PAPS) transfiere grupos sulfato.

Otros nucleótidos integran factores indispensables para la acción de enzimas. Estos factores, llamados coenzimas, a menudo presentan estructura nucleotídica.

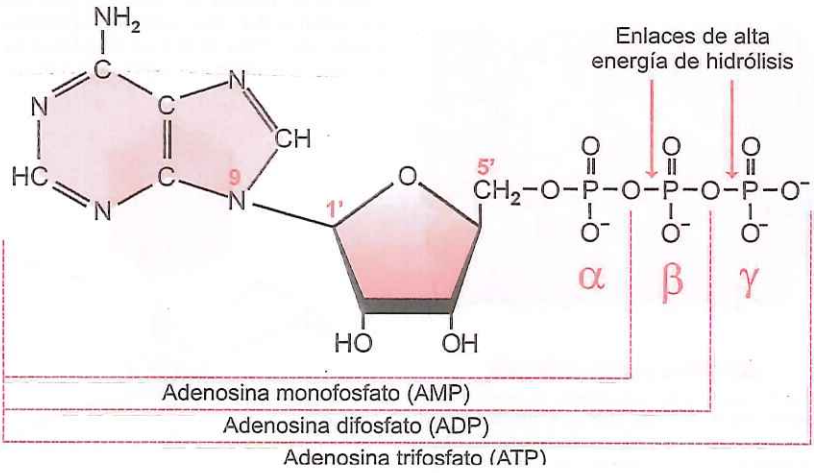


Fig. 6-24. Adenosina trifosfato (ATP).

Algunos nucleótidos sirven como intermediarios en sistemas de transmisión de señales (pág. 493), por ejemplo, el AMP-3', 5'-cíclico, así llamado porque el fosfato forma un ciclo entre carbonos 3' y 5' de la ribosa (fig. 6-25). Este compuesto se forma en el organismo a partir de ATP por acción de *adenilato ciclasa*, enzima regulada por distintas hormonas. El AMP cíclico es un mensajero químico, intermediario de esas hormonas.

El guanosina monofosfato-3',5'-cíclico (GMP cíclico) es otro importante nucleótido que actúa como mensajero intracelular.

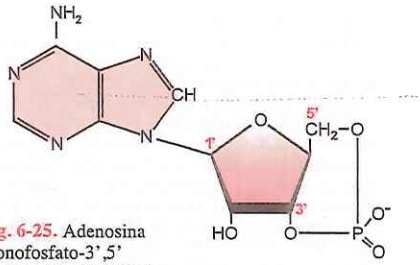


Fig. 6-25. Adenosina monofosfato-3',5' -cíclico (AMP cíclico).

RESUMEN

Ácidos nucleicos. Desempeñan muy importantes funciones: a) depositarios de la información genética; b) tienen un papel principal en la síntesis de proteínas en la célula. Son macromoléculas poliméricas lineales; las unidades estructurales son nucleótidos. *Nucleótidos*, formados por unión de una base nitrogenada, aldopentosa y ácido fosfórico. Las bases nitrogenadas son de dos tipos: pirimídicas y púricas. Entre las primeras se encuentran timina (T), citosina (C) y uracilo (U); entre las segundas, adenina (A) y guanina (G). La aldopentosa es D-ribosa en ácido ribonucleico (ARN) o D-2-desoxirribosa en ácido desoxirribonucleico (ADN); la pentosa se une por enlace β-glicosídico a N1 de bases pirimídicas o a N9 de bases púricas, para formar *nucleósidos*. Por esterificación con ácido fosfórico del C5' de la pentosa de un nucleósido se obtiene un *nucleótido*. Los ácidos nucleicos son polinucleótidos; las unidades se unen mediante enlaces éster entre el fosfato de un nucleótido con el OH de C3' de la pentosa de otro.

ADN. Se encuentra en núcleos celulares formando cromatina; una cantidad muy pequeña está localizada en mitocondrias. Los individuos de la misma especie tienen igual cantidad de ADN en cada célula (6 pg en humanos). Las gametas femenina y masculina contienen la mitad. Las moléculas de ADN alcanzan enormes longitudes, del orden de centímetros, mientras el eje transversal es de 2 nm. Por hidrólisis de ADN se obtienen nucleótidos con las bases púricas adenina (A) y guanina (G) y las pirimídicas timina (T) y citosina (C). En toda muestra de ADN, cualquiera sea su origen, se mantiene una relación definida entre cantidad de bases púricas y pirimídicas: A + G es siempre igual a T + C. A/T y G/C son siempre iguales a 1. La molécula de ADN es una doble hélice formada por cadenas polinucleotídicas enrolladas sobre el mismo eje. La sucesión de desoxirribosas y fosfatos tendidos entre C5' y C3' de pentosas forman la hebra continua de cada cadena. Bases púricas y pirimídicas, estructuras planas, se proyectan hacia el interior en sentido perpendicular al eje de la doble hélice. El primer nucleótido de cada cadena tiene libre el fosfato unido a C5' (extremo 5'); el último nucleótido no tiene esterificado el C3' de su desoxirribosa (extremo 3' o fin de la cadena). Cada vuelta de hélice tiene una extensión de 3,4 nm y entre las bases hay una distancia de 0,34 nm. Una vuelta de hélice comprende 10 bases nitrogenadas. La hélice es dextrógira o derecha (se enrolla en el sentido de las agujas del reloj). Las dos cadenas del ADN son *antiparalelas*: una marcha en sentido 5'→3', y la otra, 3'→5'. El enrollamieno de las hélices forma dos surcos paralelos a las cadenas, uno más ancho (surco mayor).

La secuencia de nucleótidos en las cadenas tiene gran importancia, ya que el ordenamiento de bases constituye la "clave" o "código" con el cual se inscribe la información genética. Las bases púricas y pirimídicas de cada cadena, dirigidas hacia el eje central, se enfrentan de manera definida. Siempre frente a adenina de una cadena se ubica timina en la otra; este par A-T se mantiene unido por dos enlaces de H; guanina de una hélice se aparea con citosina de la otra mediante tres puentes H. La doble hélice es muy estable, no sólo por la multitud de enlaces H entre pares de bases, sino también por interacciones que mantienen las bases apiladas en el interior de la molécula. Como consecuencia del apareamiento de bases, las dos cadenas no son iguales sino *complementarias*.

El calentamiento y algunos reactivos químicos debilitan los enlaces de H y producen separación de ambas cadenas. Este proceso es llamado desnaturalización; por espectrofotometría a 260 nm se comprueba que la absorbencia aumenta cuando las cadenas se separan (efecto hipercrómico). La temperatura a la cual la mitad del ADN en una muestra está desnaturalizada corresponde a la temperatura de fusión o Tm. La determinación de Tm da idea de la composición de bases. A mayor proporción de G-C, mayor Tm. Si se deja enfriar lentamente ADN desnaturalizado, las cadenas se reasocian y vuelven a formar dobles hélices (templado). En pruebas de reasociación de ADN desnaturalizado se comprueba la existencia, en células de eucariotas, de ADN altamente repetitivo, moderadamente repetitivo y de copia única. Es posible lograr asociación de cadenas de ADN procedentes de organismos diferentes cuando en ellas existen zonas complementarias (hibridación).

El ADN de células eucariotas se encuentra asociado a proteínas, formando *cromatina*. Esas proteínas son de carácter básico (predominantemente histonas). En la cromatina, la molécula de ADN, a intervalos regulares, da dos vueltas sobre

un núcleo constituido por un octámero de histonas (las dos vueltas abarcan 146 pares de bases). El núcleo de histonas y la superhélice de ADN forman un *nucleosoma*. Los nucleosomas están conectados por un tramo de ADN de una extensión de unos 50 pares de bases. Estas estructuras se encuentran extendidas durante la interfase; al iniciarse la mitosis, se empaquetan en un solenoide de 6 nucleosomas por vuelta. La *heterocromatina* es cromatina altamente condensada, inactiva. En bacterias, plásmidos, mitocondrias y cloroplastos se encuentra ADN circular.

ARN. Polinucleótido; difiere estructuralmente del ADN: a) ribosa en lugar de desoxirribosa; b) uracilo en vez de timina; c) formado por una sola cadena. Se distinguen ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt) y ARN ribosomal (ARNr). *ARNm*: constituye aproximadamente 5% del ARN total en la célula; se encuentra en núcleo y citoplasma. Su masa y composición son muy variables. En todos los ARNm el extremo 5' se une a 7-metilguanosina trifosfato y el extremo 3' tiene un trozo de 100 a 250 unidades de ácido adenílico ("cola" de poli-A). El ARNm transmite información genética desde ADN nuclear a citoplasma, donde se realiza la síntesis de proteínas. Es el ARN más lábil. Si se mezclan ADN desnaturalizado y ARN con segmentos complementarios, se forman dobles hélices "híbridas" ADN-ARN. *ARNt*: o soluble, es el de menor masa (25 kDa), formado por unos 75 nucleótidos. Transporta aminoácidos hacia el lugar de síntesis de proteínas. Presenta bases poco frecuentes en otros ARN, como dihidrouridina, seudouridina, inosina y A, G, U, C metiladas. La molécula tiene en conjunto forma de L, posee tres asas y segmentos en doble hélice. El extremo 5' está formado por un resto G o C; en el extremo 3', los tres últimos nucleótidos son siempre CCA. A este extremo se une el aminoácido. *ARNr*: es el más abundante en la célula (aproximadamente 80% del total). Es grupo prostético de nucleoproteínas que forman los ribosomas, partículas constituidas por una partícula mayor (60 S) compuesta por 3 moléculas de ARN y alrededor de 45 de proteína, y una partícula menor (40 S), 1 molécula de ARN y unas 30 de proteína. Ambas porciones presentan conformación irregular y se asocian durante la síntesis de cadenas polipeptídicas. Al microscopio electrónico, se ven conjuntos de varios ribosomas "enhebrados" a una molécula de ARNm como cuentas de un rosario (polisomas). Otros tipos de ARN son ARN nuclear pequeño que integra partículas designadas con las siglas snRNP y citosólico pequeño (scRNP).

Virus. Agentes de enfermedades en animales y vegetales. Se reproducen a expensas de la célula que invaden. Son partículas formadas por ácidos nucleicos rodeados de proteínas. La cubierta proteínica se llama cápsida, formada por unidades polipeptídicas o capsómeros. En el interior de la cápsida se aloja el material genético, constituido por ADN o ARN, comúnmente de una sola hebra.

Nucleótidos libres. En el organismo se encuentran nucleótidos con dos o tres restos ortofosfato. Los enlaces de los dos últimos fosfatos tienen alta energía de hidrólisis. El más abundante es adenosina trifosfato (ATP), principal portador de energía en seres vivos. GTP también cumple funciones importantes. Nucleósidos difosforados (UDP, CDP y PAPS) transfieren moléculas en procesos de síntesis. Otros nucleótidos forman parte de coenzimas. AMP-3',5'-cíclico y GMP-3',5'-cíclico tienen importante papel como "mensajeros" químicos.

BIBLIOGRAFÍA

Fifty years of DNA. (2003). Serie de artículos sobre ADN. *Nature*, 421: 395-453.

Krebs J.E:, Goldstein E.S., Kilpatrick S.T. (2013). *Lewin's Genes XI*, Jones and Bartlett Publishers Inc., Burlington.

Turner R. (Ed.). (2002). RNA. *Nature*, 418: 213-258.

Van Holde K.E., Zlatanonovai J. (1995). Chromatin higher order structure: Chasing mirage. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 8373-8376.

Watson J.D., Baker T.A., Bell S.P., Gann A., Levine M., Losick R. (2008). *Molecular Biology of the Gene*, 6ta. Ed., Pearson/ Benjamin Cummings, San Francisco.

CAPÍTULO 7

Elementos de termodinámica y cinética bioquímicas

Los capítulos precedentes describen las principales clases de compuestos constituyentes de los seres vivos. Las biomoléculas presentadas no se comportan en células y tejidos como estructuras estáticas e inmutables; son entidades en permanente cambio. En todo organismo viviente se producen miles de reacciones químicas, cuyo conjunto recibe el nombre de *metabolismo*. En condiciones normales, esas reacciones se cumplen ordenadamente, según estrategias desarrolladas y perfeccionadas a lo largo de muchos millones de años de evolución. Su estudio es el tema de la bioquímica dinámica y ocupará el resto de este libro.

Este capítulo presenta conceptos relacionados con las reacciones químicas, a manera de introducción a los temas contenidos en los dos capítulos siguientes (Enzimas y Bioenergética).

TERMODINÁMICA

Además de sustancias reactivas y productos, en toda reacción química debe considerarse otro ingrediente, la *energía*. Las transformaciones químicas se acompañan de cambios energéticos. El conocimiento de estos cambios es importante en bioquímica, pues permite entender la lógica y sentido de los procesos metabólicos.

La *termodinámica* es la rama de la física que trata de la energía y sus transformaciones. Sus principios básicos, enunciados a continuación, son aplicables a los procesos biológicos.

Primera ley: ***La energía total del universo permanece constante.***

(Todas las formas de energía son interconvertibles, la energía no se crea ni se destruye).

Segunda ley: ***La entropía del universo va en aumento.***

(La entropía es asimilada con la aleatoriedad o el desorden).

Energía

Habitualmente se la define como capacidad para realizar trabajo. Los diferentes tipos de energía: química, térmica, mecánica, eléctrica, radiante, etc., pueden interconvertirse.

En los procesos biológicos ocurren frecuentes interconversiones energéticas. El desarrollo y crecimiento de un organismo, así como la continua renovación de sus estructuras, implican un gran número de síntesis químicas sólo posibles con aporte de energía; de igual modo, el mantenimiento de la temperatura corporal en animales endotermos, el trabajo mecánico de músculos, cilias y flagelos, la generación de impulsos eléctricos en sistema nervioso, el transporte de sustancias contra gradiente a través de membranas, etc., son todos procesos que demandan energía.

La fuente primaria de energía para todas las formas de vida es la radiación solar. Esta es captada y almacenada como energía química por organismos fotosintéticos y transferida a otros seres a través de la cadena nutricia de la biosfera. En organismos aerobios, la energía es generada principalmente por oxidación de sustancias incorporadas con los alimentos y transferida a compuestos que la retienen para ser utilizada en el momento necesario.

Como puede advertirse, la energía química tiene un papel preponderante en los procesos bio-

lógicos. La energía química de un compuesto está representada por el movimiento y posición relativa de los átomos y partículas componentes; por los enlaces y atracciones entre esos elementos, etc. Al producirse una transformación química, frecuentemente se rompen o se forman enlaces, y a menudo el contenido energético de las moléculas involucradas disminuye o aumenta. El curso de cualquier reacción química es determinado, en última instancia, por el contenido de energía del sistema en consideración y por el intercambio de energía entre él y su entorno.

Cambios de energía en reacciones químicas

Se utiliza el término *sistema* para designar a la porción de materia que deseamos estudiar; toda otra materia será el *medio* o entorno del sistema.

El contenido total de energía del sistema antes de ocurrir reacción alguna, es el *estado inicial*, mientras el contenido energético después de producido el cambio, será el *estado final*. Mientras el sistema cursa desde estado inicial a final, puede liberar energía al medio o tomarla de él. Desde el punto de vista termodinámico, interesa la diferencia de energía entre estado inicial y final, no el mecanismo por el cual se cumple el proceso. Esa diferencia será la misma cualesquiera sean las etapas o vías utilizadas durante la reacción.

Medir el contenido de energía de un sistema puede ser muy difícil; en cambio, resulta más fácil determinar el cambio de energía producido entre los estados inicial y final (cambio se simboliza con la letra griega delta mayúscula: Δ).

La forma más común de energía es el calor. Prácticamente todos los procesos químicos son acompañados por consumo o producción de calor. En el primer caso se denominan *endotérmicos*, en el segundo, *exotérmicos*.

Según la primera ley de la termodinámica, es posible determinar el cambio de energía en una reacción si se mide la ganancia o pérdida de calor en el sistema en condiciones de temperatura y presión constantes. Esta medición puede llevarse a cabo mediante una bomba calorimétrica en la cual la energía liberada por la reacción calienta un volumen conocido de agua que rodea al calorímetro. El producto del aumento de temperatura por el peso del agua da el calor desprendido, que generalmente se mide en calorías.

Una caloría (cal) es la cantidad de calor necesaria para elevar de 14,5 a 15,5°C la temperatura de 1 g de agua. Se utiliza habitualmente un múltiplo mil veces mayor, la kilocaloría (kcal o Cal). La caloría ha sido una unidad muy utilizada por los químico-biólogos en el pasado. Actualmente se tiende a usar el *Joule*[1], unidad del Sistema Internacional (SI), para expresar energía. Una caloría equivale a 4,184 Joules. Se trata de unidades muy pequeñas, razón por la cual se emplea más comúnmente el kiloJoule (kJ).

Cuando se oxida una sustancia se produce energía que puede liberarse al medio en forma de calor. La magnitud de este "calor de combustión" depende de la estructura molecular de la sustancia y el contenido de energía remanente en los productos formados. Si se oxida un mol (342 g) de azúcar común (sacarosa) hasta CO_2 y H_2O, se producen 1.350 kcal (5.648 kJ) (la energía potencial de la sacarosa está representada por los enlaces y sus angulaciones, configuración de la molécula, etc.; el contenido energético de los productos CO_2 y H_2O, más simples y estables, es mucho menor).

Calor de combustión es la máxima energía que se puede obtener de una sustancia por oxidación completa de los elementos constituyentes.

Cuando la reacción tiene lugar a presión constante, el cambio de calor producido es denominado cambio de *entalpía* y se simboliza con la notación ΔH. Se le da signo negativo cuando el calor es liberado.

Entalpía (H) es la energía calórica liberada o consumida en un sistema a temperatura y presión constantes. Cuando no se modifica el volumen, es decir, cuando no se produce trabajo alguno en el sistema, el cambio de energía (ΔE) es igual al cambio de entalpía (ΔH).

El calor es el medio más simple por el cual la energía puede ser aplicada a la producción de trabajo. El ejemplo de motores y máquinas ideados por el hombre resulta familiar en este sentido. Pero en los sistemas biológicos, que operan a temperatura y presión constantes, el calor no es utilizable.

Segunda ley de la termodinámica

La primera ley de la termodinámica permite comprender y determinar los cambios de energía producidos en una reacción química, pero no puede predecir en qué dirección transcurrirá ésta. Podría pensarse que una reacción siempre se desplaza en el sentido en el cual el ΔH es negativo (exotérmica) y que no ocurre cuando el ΔH es positivo (endotérmica). Pero esto no es así, el ΔH no es el único factor que decide el sentido de una

[1] *Joule* = 10^7 *ergios*. *Ergio*, unidad de trabajo, corresponde al trabajo realizado cuando actúa una *Dina* a lo largo de 1 cm. *Dina*, fuerza que actuando durante 1 segundo sobre una masa de 1 g produce en ella un movimiento de velocidad de 1 cm por segundo.

reacción. La segunda ley introduce otro elemento a tener en cuenta, la *entropía*.

Si a un sistema con un contenido energético dado se le suministra una cantidad de calor Q, por el principio de conservación de energía, el calor agregado aparecerá como cambio en el contenido energético del sistema (ΔE) y/o se realizará algún trabajo (W) sobre el medio. Esto se representa con la ecuación $Q = \Delta E + W$, que puede transformarse en $\Delta E = Q - W$. Esta ecuación es expresión de la primera ley, esto es, el flujo de calor entre el sistema y sus alrededores se acompaña de cambios en la energía del sistema y/o trabajo efectuado en el medio, que se compensan exactamente. Sin embargo, la conversión de calor en trabajo mecánico nunca es completa en la práctica.

Por ejemplo, en una máquina accionada por vapor de agua que ingresa con temperatura T_1 y sale después de su utilización a temperatura menor, T_2, la diferencia permitirá conocer el calor extraído, al cual llamaremos Q. Este calor será convertido, tanto como sea posible, en trabajo útil. Si se llama W al máximo de trabajo útil obtenido, se tendrá:

$$W = Q\frac{T_1 - T_2}{T_1} = Q - Q\frac{T_2}{T_1} \qquad (1)$$

donde T_1 y T_2 son temperaturas absolutas.

A menos que T_1 sea infinito o T_2 igual a 0 absoluto (–273°C), condiciones imposibles de alcanzar en la práctica, el trabajo útil será siempre menor que el total de energía suministrada por un factor igual a $Q\,(T_2/T_1) = (Q/T_1)T_2$.

La relación Q/T_1 se conoce como *entropía del sistema* (S). La cantidad de energía no disponible para realizar trabajo útil $(Q/T_1)T_2$ o ST_2, es la energía perdida en el proceso de transferencia.

La ecuación (1) es similar a:

$$G = H - TS$$

donde G (en honor de Gibbs, físico-matemático que desarrolló la aplicación de la termodinámica a la química) es *energía libre*, análoga a W (trabajo útil), H (entalpía) es análoga a Q (contenido de calor del sistema a presión constante) y S (entropía), análoga a Q/T_1 energía calórica no aprovechada.

Energía libre

En las condiciones en las cuales se desenvuelven los organismos vivientes, las reacciones químicas se realizan en un medio de temperatura y presión constantes. Sólo una fracción de la energía liberada en los procesos bioquímicos es disponible para realizar trabajo de algún tipo, es la llamada *energía libre*.

En una reacción química, si el o los reactivos poseen un contenido de energía mayor que el o los productos, se liberará energía durante la reacción. Aquí no interesa tanto el contenido energético de reactivos y productos, muy difícil de medir, sino el cambio producido durante la reacción. El cambio de energía libre en el sistema es dado por la ecuación:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

donde ΔG: cambio de energía libre, ΔH: cambio de entalpía, T: temperatura absoluta (°C + 273 = °K = grados Kelvin) y ΔS: cambio de entropía.

Entropía es energía degradada, no utilizable para realizar trabajo. Sólo el cambio de energía libre (ΔG) es disponible para efectuar trabajo.

Sentido de una reacción química

En las reacciones químicas se puede predecir que ocurrirán espontáneamente las reacciones en las cuales hay reducción de energía libre. Cuando un sistema pierde energía libre durante la reacción, la G del sistema disminuye en una cantidad definida y el ΔG tendrá signo negativo. Si la energía libre del sistema aumenta, el cambio tendrá signo positivo. Para que una reacción transcurra espontáneamente, debe haber disminución de energía libre, lo cual se representa como –ΔG.

La tendencia a aumentar la entropía es la fuerza que determina la dirección del proceso. El calor será liberado o absorbido por el sistema para permitir que él y el medio alcancen el estado de mayor entropía, obedeciendo así la segunda ley de la termodinámica. Así como la entropía tiende a aumentar, la energía libre tiende a disminuir.

Todos los procesos químicos transcurren con declinación de energía libre hasta alcanzar un equilibrio en el cual es mínima; simultáneamente hay aumento de entropía, que en el equilibrio es máxima. Es posible determinar el cambio de energía libre (ΔG) de una reacción química y, en consecuencia, predecir su sentido.

Equilibrio químico

Sea una reacción reversible en la cual dos sustancias A y B (reactivos) se combinan para formar C y D (productos). Designamos 1 o *directa* a esta reacción, indicada en la ecuación con la flecha de izquierda a derecha. A su vez, las sustancias C y D pueden combinarse para reconstituir A y B;

ésta será la reacción 2 o *inversa*, señalada por la flecha de derecha a izquierda.

$$A + B \underset{2}{\overset{1}{\rightleftharpoons}} C + D$$

La velocidad a la cual transcurren estas reacciones será, según la ley de Guldberg y Waage de acción de las masas[2]:

reacción directa (1): $v_1 = k_1 [A] [B]$
reacción inversa (2): $v_2 = k_2 [C] [D]$

los corchetes indican concentración; v_1 y v_2, velocidades de las reacciones 1 y 2 respectivamente; k_1 y k_2, constantes de velocidad, características para cada reacción a una temperatura determinada.

Al iniciarse la reacción, A y B se combinan y forman C y D. A medida que transcurre este proceso, las concentraciones de A y B disminuyen y, por lo tanto, también la velocidad de la reacción. Por otra parte, las sustancias C y D producidas reaccionan entre sí para reformar A y B con una velocidad proporcional a su concentración. Llega un momento en el cual las velocidades de la reacción directa e inversa se igualan y no se producen más cambios en las concentraciones de reactivos y productos; v_1 será igual a v_2.

Si $v_1 = v_2$, entonces:

$$k_1 [A] [B] = k_2 [C] [D] \qquad (2)$$

La reacción ha alcanzado el *equilibrio*. Es este un equilibrio dinámico, ya que las moléculas de A y B siguen reaccionando para formar C y D y viceversa; las velocidades a las cuales ocurren ambos procesos son iguales, razón por la cual no hay modificaciones en la concentración de cada una de las sustancias participantes.

Si en la ecuación (2) trasponemos términos:

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

Como k_1/k_2 es un cociente entre constantes, el resultado será también un valor constante, al cual se lo llama *constante de equilibrio* (K_{eq}). Para cada reacción química, a una temperatura definida, el valor de K_{eq} es característico.

$$K_{eq} = \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

Un razonamiento análogo se hizo al considerar disociación iónica (pág. 12).

2 *Ley de Guldberg y Waage*: La velocidad de una reacción química es proporcional al producto de las masas de las sustancias reactivas.

Durante la conversión de los reactivos A y B en productos C y D, y también en la reacción inversa, se producen cambios energéticos. Las moléculas involucradas en la reacción poseen energía, representada por los enlaces e interacciones de los átomos componentes; al producirse una transformación química, el contenido energético de los reactivos puede ser mayor o menor que el de los productos.

Si la K_{eq} es mayor que 1, la reacción transcurre predominantemente hacia la derecha; si es menor que 1, ocurre preferentemente de derecha a izquierda. En otros términos, el valor de equilibrio está relacionado con la tendencia a alcanzar el mínimo de energía libre y, por ende, debe ser función del ΔG en la reacción. Esta relación se expresa en la ecuación:

$$\Delta G° = -RT.\ln K_{eq} \qquad (3)$$

donde $\Delta G°$ es *cambio de energía libre estándar* [condiciones estándar corresponden a temperatura de 25°C (298° K) y concentración 1 M de reactivos]; R, constante de los gases (8,314 J/mol·grado o 1,987 cal/mol·grado); T, temperatura absoluta y ln K_{eq}, logaritmo natural o neperiano de la constante de equilibrio; $\ln K_{eq}$ se transforma en logaritmo decimal (de base 10) multiplicando por el factor 2,303, con lo cual la ecuación se convierte en:

$$\Delta G° = -RT(2{,}303)\log K_{eq}$$

Como la mayoría de reacciones biológicas ocurren a pH próximo a 7, se consideran las reacciones a este pH; $\Delta G°$ se representa por $\Delta G°'$ (*cambio de energía libre estándar a pH 7*).

El cambio de energía libre estándar da la cantidad máxima de trabajo que la reacción puede realizar en condiciones isotérmicas. Esta cantidad de trabajo podría teóricamente efectuarse si existiese un dispositivo para evitar pérdida de energía (fricción o roces inútiles). Si tal dispositivo no existe, la fricción producirá calor, que se libera sin realizar trabajo.

La relación entre el valor de la constante de equilibrio y $\Delta G°$ indica que cuando K_{eq} es alta (mayor que 1), $\Delta G°$ es negativo, la reacción transcurre con disminución de energía libre. Cuando la K_{eq} es baja (menor que 1), $\Delta G°$ es positivo y debe suministrarse energía para que la reacción se produzca (en condiciones estándar).

Cuando el $\Delta G°$ de una reacción es negativo se la llama *espontánea* (sin embargo, como se verá más adelante, esto no significa que el proceso ocurrirá por sí solo o rápidamente). La combus-

tión de sacarosa es un proceso espontáneo porque tiene un $\Delta G°$ negativo, pero la sacarosa puede estar años en contacto con aire en una habitación (a unos 20°C) sin producirse combustión alguna).

Las reacciones cuyo cambio de energía libre estándar es negativo son *exergónicas*. Las reacciones con $\Delta G°$ positivo no son espontáneas y no se realizarán a menos que se suministre energía. Tales procesos se llaman *endergónicos*.

El valor de $\Delta G°$ se determina midiendo las concentraciones de productos y reactivos en equilibrio, en condiciones estándar. El valor del cambio de energía libre estándar es útil para predecir si una reacción ocurrirá o no en condiciones estándar. Si $\Delta G°$ es menor que 0, la reacción es espontánea; si el $\Delta G°$ es mayor que 0, la reacción no ocurrirá por sí sola.

En la ecuación (3), $\Delta G°$ refiere a un sistema en equilibrio, incapaz de producir trabajo útil, pues no hay más cambios netos en las concentraciones de reactivos y productos. En cambio, un sistema que no ha alcanzado el equilibrio puede producir trabajo durante su transición hacia ese equilibrio. El ΔG, energía útil para realizar trabajo a temperatura y presión constantes, está relacionado con $\Delta G°$ por la ecuación:

$$\Delta G = \Delta G° + RT \ln \frac{[\text{productos}]}{[\text{reactivos}]}$$

o, en logaritmos decimales:

$$\Delta G = \Delta G° + 2{,}303\, RT \log \frac{[\text{productos}]}{[\text{reactivos}]} \quad (4)$$

Cuando la concentración de productos es igual a la de reactivos ([productos]/[reactivos] = 1), como log 1 = 0, entonces $\Delta G = \Delta G°$. Por otro lado, en equilibrio no hay cambio de energía libre, por lo tanto, en equilibrio $\Delta G = 0$.

El valor ΔG determina si una reacción ocurre en condiciones diferentes de las estándar, tales como las existentes en la célula. Aun cuando el $\Delta G°$ de una reacción sea positivo, la posibilidad de su curso espontáneo no está excluida, ya que modificando las concentraciones de productos [P] y/o de reactivos [R], se pueden alcanzar valores de log [P]/[R] suficientemente negativos como para hacer negativo el valor de ΔG.

En la célula no se dan condiciones de equilibrio. Cambiando concentraciones de reactivos y/o productos se modifica el valor de ΔG (ecuación 4) y de éste depende realmente si la reacción ocurre o no. Citaremos un ejemplo: sea la reacción dihidroxiacetona-P $\rightarrow$ gliceraldehído-3-P (etapa de la glucólisis, principal vía de utilización de glucosa). El $\Delta G°'$ es igual a +7,53 kJ/mol. De acuerdo con lo expuesto, la reacción no ocurrirá espontáneamente en el sentido indicado por la flecha. Pero en las células las concentraciones de reactivo y producto están muy lejos de 1 M. Valores fisiológicos son, por ejemplo, $2 \cdot 10^{-4}$ M para dihidroxiacetona-P y $3 \cdot 10^{-6}$ M para gliceraldehído-3-P. Reemplazando estos valores en la ecuación (4) se obtiene un $\Delta G = -2{,}93$ kJ/mol. El ΔG es negativo; la reacción transcurrirá en la dirección señalada.

El ΔG de una reacción puede ser menor, mayor o igual que el $\Delta G°'$ según las concentraciones de reactivos y productos. El criterio de espontaneidad de una reacción es el valor de ΔG, no de $\Delta G°'$. Sin embargo, se acostumbra dar el valor de $\Delta G°'$ cuando se describen las reacciones biológicas. Ello sólo sirve como una aproximación a su posible comportamiento.

Sin duda, es de interés conocer el valor de ΔG para un sistema que no está en equilibrio, la situación más frecuente en sistemas biológicos. Este puede ser determinado a partir de $\Delta G°$ y de las concentraciones reales de productos y reactivos según la ecuación (4). Si ΔG es negativo, en las condiciones de la célula, la reacción procederá hacia la formación de productos. Si ΔG es positivo, la reacción marchará en sentido opuesto.

En sistemas biológicos, el estado de equilibrio es la excepción; a tal punto, que se ha definido a la vida como la capacidad para utilizar energía de una fuente externa a fin de mantener las reacciones químicas del organismo en estado de no equilibrio. El equilibrio se alcanza con la muerte.

En la reacción A+B = C+D se puede evitar que se alcance el equilibrio, por ejemplo, eliminando C y/o D a medida que se forman, convirtiéndolos en otros productos, o agregando A y B a medida que se consumen. Los procesos químicos en las células muestran series de reacciones en las cuales los productos de una son utilizados como reactivos por la siguiente. Esta remoción permanente de productos impide llegar al equilibrio y favorece la producción de la reacción en un sentido determinado.

La célula como sistema "abierto"

Los principios de la termodinámica se aplican a sistemas *cerrados*, que no intercambian materia con el medio y pueden alcanzar un equilibrio termodinámico.

Las células vivas son sistemas *abiertos*, en permanente intercambio de materia y energía con el ambiente. Si bien las concentraciones de

muchos de los componentes de la célula pueden parecer invariables, en realidad se encuentran en *estado dinámico estable* en el cual la velocidad de formación de un determinado compuesto es balanceada por su tasa de remoción. Esto es diferente al equilibrio en sentido termodinámico.

Los procesos biológicos parecen contradecir la segunda ley de la termodinámica en cuanto implican aumento de energía libre y orden del sistema. La utilización de energía para síntesis de estructuras moleculares altamente ordenadas, por ejemplo, significa disminución de entropía del sistema. Pero esto se realiza a costa de un aumento del desorden en el medio. Los organismos vivientes son sistemas abiertos, existen en estado dinámico, aumentan la entropía del universo y, por lo tanto, son irreversibles.

Compuestos de alta energía

Los procesos endergónicos en seres vivos serían inviables, desde el punto de vista termodinámico, si no existiese aporte de energía. El recurso utilizado para contrarrestar el ΔG positivo es el acoplamiento con reacciones en las cuales participan sustancias de "alto contenido energético". Por ejemplo, la síntesis de glucosa a partir de CO_2 y H_2O es un proceso endergónico. En organismos fotosintéticos, la energía para la síntesis es provista por la luz; un número determinado de fotones es captado por pigmentos presentes en las células. En estas condiciones, si se analiza energéticamente el proceso incluyendo entre los reactivos a los pigmentos activados, el resultado final es disminución de energía libre.

En organismos animales, los procesos de síntesis se efectúan a través de etapas en las cuales los reactivos son "activados" por aporte de energía cedida por compuestos de alto contenido energético. De esta manera, las reacciones de biosíntesis se producen con liberación de energía libre y, por lo tanto, son termodinámicamente posibles.

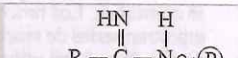
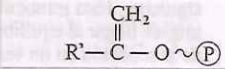
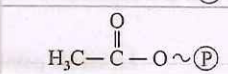
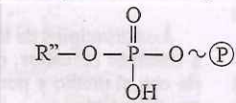
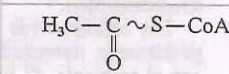
Hay gran número de compuestos "ricos" en energía comprometidos en la operación de la maquinaria metabólica de las células; se caracterizan por poseer enlaces cuya ruptura produce una disminución importante de energía libre. Cuando estos compuestos participan en reacciones, el cambio de energía libre negativo hace posible la ocurrencia simultánea de reacciones endergónicas.

En bioquímica se considera de "alta energía" una unión química cuando el cambio de energía libre de la reacción que involucra a esa unión es mayor que 20 kJ/mol (ΔG de –20 a –60 kJ/mol).

En la notación química se acostumbra indicar las uniones de alta energía mediante el signo $\sim$.

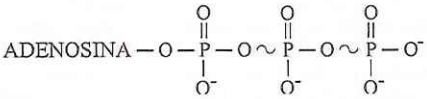
La tabla 7-1 presenta ejemplos de compuestos ricos en energía. Muchos de ellos contienen fosfatos (Ⓟ), acetil-coenzima A es un tioéster. Compuestos con restos fosfato de alta energía de hidrólisis, algunos de los cuales figuran en la tabla, participan en reacciones de transferencia de grupo fosforilo a otros compuestos de menor energía libre. La capacidad de una sustancia para ceder un resto fosfato a otra se llama *potencial de transferencia de grupo fosforilo*. El valor de este potencial se expresa con el del $\Delta G°$ cambiado de signo.

Tabla 7-1. Compuestos ricos en energía.

Compuesto		$\Delta G°'$ kJ/mol	$\Delta G°'$ kcal/mol
Creatina-fosfato		-43,9	-10,5
Fosfoenol-piruvato		-61,9	-14,8
Acetil-fosfato		-42,2	-10,1
Adenosina-difosfato		-30,5	-7,3
Acetil-coenzima A		-43,9	-10,5

Para fosfoenolpiruvato es 14,8 kcal/mol 61,9 (kJ/mol); para ATP, 7,3 kcal/mol (30,5 kJ/mol).

El compuesto de alta energía de mayor importancia es *adenosina trifosfato (ATP)*. En el ATP los enlaces anhídrido fosfórico entre los restos fosforilo segundo (β) y tercero (γ) y entre el primero (α) y segundo (β) tienen alta energía libre de hidrólisis.



El elevado contenido energético de una unión química no es propiedad aislada de un tipo particular de enlace; está dado por tensiones intramoleculares que desaparecen al producirse la hidrólisis del enlace.

A pH fisiológico, los restos fosfato de ATP se encuentran desprotonados; la forma iónica predominante es ATP^{4-}. Las cargas negativas se encuentran muy próximas entre sí, y la repulsión electrostática crea tensiones intramoleculares. Al producirse hidrólisis de ATP en ADP y fosfato, o en AMP y pirofosfato, hay importante reducción de energía libre, pues los productos están menos tensionados. Por otra parte, el fosfato es estabilizado por formación de híbridos de resonancia, mientras que en ATP este factor carece de importancia. Además, ADP y fosfato se solvatan mejor que ATP en medio acuoso. El fenómeno de estabilización por resonancia y la solvatación de los productos también contribuyen a disminuir la energía libre y a desplazar la reacción en el sentido de la hidrólisis.

La energía de las uniones fosfato en ATP puede ser retenida en el organismo hasta el momento en el cual éste la requiera, transportada dentro de la célula hacia los sitios de utilización y transferida para formar otros compuestos de alta energía, como uridina trifosfato (UTP), acilcoenzima A, etc.

Reacciones energéticamente acopladas

Una reacción altamente exergónica puede impulsar el curso de otra endergónica si ambas se acoplan. Comúnmente las reacciones acopladas comparten un intermediario común. Por ejemplo, sea la reacción exergónica:

$$A+B \rightarrow C+D \quad \Delta G^{\circ\prime} = -8{,}0 \text{ kcal/mol } (-33{,}5 \text{ kJ/mol}) \quad (5)$$

y la reacción endergónica:

$$D+E \rightarrow F+G \quad \Delta G^{\circ\prime} = +3{,}0 \text{ kcal/mol } (+12{,}5 \text{ kJ/mol}) \quad (6)$$

Las reacciones (5) y (6) comparten D, que es producto en la primera y reactivo en la segunda. Ambas reacciones pueden acoplarse, en cuyo caso la reacción total se representa:

$$A+B+E \rightarrow C+F+G \quad (7)$$

El $\Delta G^{\circ\prime}$ de reacciones acopladas es igual a la suma de los $\Delta G^{\circ\prime}$ de las reacciones individuales. En el caso de la reacción (7), $\Delta G^{\circ\prime}$ será igual a $-8 + 3 = -5$ kcal/mol o -21 kJ/mol; es decir, el proceso total resulta espontáneo.

La hidrólisis de ATP es una reacción exergónica, con $\Delta G^{\circ\prime}$ de 7,3 kcal/mol (–30,5 kJ/mol) por cada uno de los enlaces ricos de energía. Este valor corresponde a condiciones estándar (25°C, concentración 1 M de reactivos y pH 7,0). En las condiciones imperantes en la célula, ΔG es en realidad mayor.

$$ATP + H_2O \rightarrow ADP + P_i + \text{Energía}$$

P_i indica fosfato inorgánico

La formación del éster glucosa-6-fosfato, en cambio, es una reacción endergónica, con $\Delta G^{\circ\prime}$ de +3,3 kcal/mol (+13,8 kJ/mol).

$$\text{Glucosa} + P_i + \text{Energía} \rightarrow \text{Glucosa-6-P} + H_2O$$

De acuerdo con lo expuesto, esta segunda reacción no ha de transcurrir espontáneamente. Sin embargo, puede producirse si se "acopla" con la anterior:

$$ATP + H_2O \xrightarrow{\text{Energía}} ADP + P_i$$

$$\text{Glucosa} + P_i \xrightarrow{\text{Energía}} \text{Glucosa-6-P} + H_2O$$

La reacción total resultante:

$$ATP + \text{Glucosa} \rightarrow \text{Glucosa-6-P} + ADP$$

tiene $\Delta G^{\circ\prime}$ de $(-30{,}5 + 13{,}8) = -16{,}7$ kJ/mol (–4,0 kcal/mol), lo cual le permite transcurrir en el sentido indicado. Se tiene un "ensamble" de un proceso exergónico con otro endergónico. El balance final indica una pérdida relativamente pequeña de energía, liberada al medio en forma de calor.

En seres vivientes, las reacciones que requieren energía son acopladas, directa o indirectamente, con hidrólisis de ATP. A menudo, los

compuestos "activados" resultantes, como glucosa-6-fosfato, son productos intermedios en vías metabólicas de síntesis o degradación.

CINÉTICA QUÍMICA

Los conceptos expuestos sobre termodinámica de reacciones químicas explican cómo es posible conocer el sentido o dirección en la cual es más probable que una reacción determinada transcurra. Pero nada dicen de cómo o a través de qué vías se produce la transformación de reactivos en productos. La *cinética* estudia la velocidad y mecanismos de las reacciones químicas.

En una reacción química se rompen y/o se forman enlaces entre átomos; se modifican interacciones de elementos en las moléculas participantes. Las moléculas reactivas deben chocar entre sí con energía suficiente y en orientación adecuada; en otros términos, las colisiones deben ser efectivas. De ellas depende la velocidad con la cual se produce una reacción.

La velocidad se expresa en términos de cantidad de reactivo convertido en producto (o de producto formado) en la unidad de tiempo (moles por seg^{-1}).

Al tratar equilibrio químico, se dijo que la velocidad de una reacción está dada por el producto de la constante de la reacción por la concentración del o de los reactivos. En la reacción:

$$A + B \underset{2}{\overset{1}{\rightleftharpoons}} C + D$$

la velocidad de la reacción 1 será:

$$v_1 = k_1 [A] [B]$$

k_1 corresponde a la constante de velocidad, que tiene un valor definido para cada sistema en condiciones determinadas.

Orden de reacción

En realidad, la ecuación de velocidad es más exactamente expresada en la forma:

$$v = k [A]^x [B]^y$$

Los exponentes x e y se determinan experimentalmente. Esos exponentes tienen comúnmente valor 1, 2, 0, pero también pueden ser fraccionarios. Los valores de x e y indican el orden de reacción, es decir, la relación existente entre velocidad de reacción y concentración de reactivo. Si $x = 1$, la reacción es de primer orden con respecto a A; si $y = 2$, la reacción es de segundo orden con respecto a B. El orden total de la reacción está dado por la suma de los exponentes $(x + y)$.

Una reacción será de *orden cero* cuando los productos se forman en cantidad constante, independientemente de la concentración de reactivos. La representación de velocidad en función de concentración de reactivos da una línea horizontal (fig. 7-1).

Reacciones en las cuales participan más de una molécula pueden ser de orden cero respecto a uno de los reactivos, pero no a todos. Esto se explica si uno de los reactivos se encuentra en cantidades limitadas y los otros en exceso. Puede suceder que la velocidad no cambie más allá de lo que fija el reactivo limitante. La velocidad, en este caso, es independiente de la concentración de reactivos no limitantes; para éstos la reacción será de orden cero.

Una reacción es de *primer orden* cuando la velocidad es proporcional a la concentración de un reactivo. El aumento en la concentración producirá incremento lineal de la velocidad (fig. 7-1).

El concepto de orden de reacción puede ser relacionado con el número de moléculas que deben chocar simultáneamente. En la reacción de primer orden, si se trata de reacciones unimoleculares, toda molécula con energía libre suficiente se convertirá espontáneamente en producto. También puede ser de primer orden una reacción bimolecular en la cual uno de los reactivos está en franco exceso con respecto al otro. La velocidad de reacción es proporcional a la concentración del que se encuentra en menor cantidad.

Es de *segundo orden* una reacción cuya velocidad está relacionada con las concentraciones de dos reactivos. En una reacción de *segundo orden* la velocidad depende de la concentración de dos reactivos o bien puede ser de segundo orden con

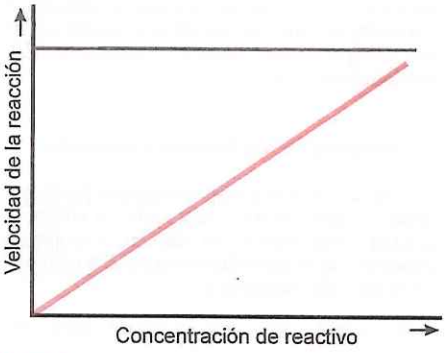


Fig. 7-1. Representación gráfica de cinética química de orden cero (línea gris) y de primer orden (línea roja).

respecto a uno de ellos, en cuyo caso la velocidad es proporcional al cuadrado de la concentración de éste. En la reacción de segundo orden, no sólo deben tener suficiente energía las dos moléculas participantes; además deben chocar entre sí en la dirección adecuada para formar el o los productos.

Energía de activación

Si los datos termodinámicos nos dicen que una reacción puede tener lugar en una determinada dirección, que el ΔG es francamente negativo, que es espontánea, etc., ¿por qué entonces no se produce de inmediato y los reactivos pueden permanecer largo tiempo juntos sin reaccionar? (ejemplo de sacarosa y oxígeno).

Independientemente de su ΔG, en toda reacción es necesario suministrar energía a los reactivos para iniciar la reacción. Ésta puede ser energía de traslación o de rotación necesaria cuando dos moléculas deben chocar entre sí para reaccionar, o energía electrónica o vibracional en reacciones unimoleculares en las cuales una molécula redistribuye o elimina algunos de sus átomos para formar el producto. En otros términos, las moléculas deben alcanzar un estado de *transición* o estado de *activación* antes que la reacción pueda cumplirse. El compuesto activado representa un intermediario a partir del cual la reacción se desarrolla espontáneamente. En este intermediario, los enlaces se "reacomodan" para producir la nueva agrupación de átomos y enlaces que dará lugar a los productos.

La energía necesaria para alcanzar el estado activado recibe el nombre de energía de activación (E_a). Dicha energía representa algo así como la barrera inicial a sortear antes de efectuar la reacción.

La velocidad a la cual se produce este intermediario de transición o activado depende de varios factores: a) diferencia entre energía del estado inicial de las moléculas reactivas (estado basal o fundamental) y energía correspondiente al estado activado de transición; esta diferencia es la *energía de activación*. A una E_a elevada, generalmente corresponde baja velocidad de reacción; b) número de colisiones efectivas; cuando la frecuencia de choques entre moléculas reactivas es baja, la velocidad es reducida, y c) necesidad de orientar adecuadamente las moléculas involucradas en la formación del estado activado.

El curso de una reacción química puede esquematizarse con una analogía mecánica (fig. 7-2). Sea, por ejemplo, una bola que debe desplazarse desde una posición A + B en la ladera de una montaña, hacia un nivel inferior (C + D). A + B, ubicados en una posición más elevada, tienen potencialmente mayor contenido energético que C + D y el ΔG del recorrido desde A + B hasta C + D tiene signo negativo. Supongamos que para llegar a la posición inferior (C + D) la esfera debe remontar primero una elevación del terreno (fig. 7-2). El recorrido no podrá cumplirse si no se suministra a la bola la energía cinética necesaria para superar esa barrera inicial.

La representación de los cambios energéticos en una reacción química es semejante si se considera la altura de los accidentes del terreno como magnitudes de energía. La diferencia de nivel entre A + B y C + D corresponde al ΔG de la reacción; la diferencia entre el nivel de A + B y el punto máximo de la elevación inicial corresponde a la energía de activación. La altura máxima indica la energía del intermediario de transición activado.

La magnitud de la energía de activación varía para cada reacción química. En nuestro ejemplo, sería mucho mayor si se pretendiese realizar la reacción a la inversa ($C + D \rightarrow A + B$).

Una reacción química puede acelerarse si se suministra energía al sistema para que mayor número de moléculas de reactivo alcancen el estado activado. Esto se lograría, por ejemplo, con aporte de calor, el cual aumenta la energía interna de las moléculas reactivas y la posibilidad de colisiones efectivas. Este recurso es comúnmente utilizado en el laboratorio, pero no es posible en los medios biológicos, que son isotérmicos.

Otra forma de acelerar una reacción es reducir la energía de activación, para que mayor número de moléculas en el sistema estén en condiciones de alcanzar el estado de transición. Este es el efecto producido por los *catalizadores*, que

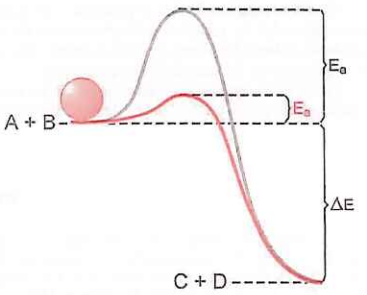


Fig. 7-2. Cambios energéticos en el curso de una reacción no catalizada (línea gris) y de una catalizada (línea roja). E_a: energía de activación. ΔE: Cambio de energía libre de la reacción. El punto más elevado alcanzado por la curva corresponde a la energía del estado activado.

aumentan notablemente la velocidad de formación del intermediario activado, disminuyendo la energía de activación. En la analogía mecánica, la acción de un catalizador equivale a disminuir la altura de la elevación inicial en el terreno (fig. 7-2). Entonces bastará un pequeño impulso para que la esfera eche a rodar. La figura 7-2 muestra la curva de los cambios energéticos de una reacción no catalizada, y los de la misma reacción catalizada.

Si bien los catalizadores aumentan la velocidad de reacción, no modifican los cambios netos de energía de la misma; el valor de ΔG y la constante de equilibrio permanecen invariables tanto si la reacción es catalizada como si no lo es.

RESUMEN

Termodinámica. Los cambios energéticos en reacciones bioquímicas obedecen a los principios fundamentales de la termodinámica: 1º. *La energía total del universo permanece constante.* 2º. *La entropía del universo va en aumento.* En las transformaciones químicas ocurren cambios de energía. El calor es una de las formas de energía más fáciles de evidenciar y medir. A presión y temperatura constantes, el cambio de calor corresponde al cambio de *entalpía* (ΔH). Cuando no se produce trabajo alguno en el sistema, el cambio de energía (ΔE) es igual a ΔH. La porción de energía liberada disponible para realizar trabajo es la *energía libre* (G). El cambio de energía libre (ΔG) de una reacción está dado por la ecuación: $\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S$. T es temperatura absoluta y ΔS, cambio de *entropía,* que corresponde a energía no disponible para realizar trabajo. Desde el punto de vista termodinámico, un organismo viviente o una célula es un *sistema abierto*, en permanente intercambio de materia y energía con su entorno.

Una reacción ocurre espontáneamente cuando su ΔG es negativo. La fuerza que determina la dirección de una reacción es la tendencia a aumentar la entropía, lo cual es equiparado a aumentar el desorden. Todos los procesos transcurren con disminución de energía libre hasta llegar al equilibrio, en el cual G es mínima. El ΔG de una reacción está relacionado con el valor de su constante de equilibrio. En condiciones estándar (298°K, concentración 1 M de reactivos), el cambio de energía libre ($\Delta G°$) es: $\Delta G° = -RT \cdot \ln K_{eq} = -RT\,(2{,}303)\log K_{eq}$. Cuando se refiere al cambio de energía estándar a pH 7,0, la notación es $\Delta G°'$. Si $K_{eq} > 1$, $\Delta G°$ será negativo; si $K_{eq} < 1$, $\Delta G°$ será positivo. En el primer caso la reacción es espontánea. Reacciones con ΔG negativo son exergónicas; con ΔG positivo, endergónicas. Cuando el sistema está en equilibrio, $\Delta G = 0$. Conociendo el valor de $\Delta G°$ de una reacción y las concentraciones de reactivos y productos, se puede determinar el sentido en el cual transcurre, ya que: $\Delta G = \Delta G° + RT \cdot \ln[\text{Productos}]/[\text{Reactivos}] = \Delta G° + 2{,}303 \cdot RT \cdot \log[\text{Productos}]/[\text{Reactivos}]$. La reacción ocurre espontáneamente si ΔG es negativo. Cuando $\Delta G°$ es positivo, si el valor de log[Productos]/[Reactivos] se hace suficientemente negativo, puede resultar un ΔG negativo. Cuando [Productos] = [Reactivos], $\Delta G = \Delta G°$.

Dos reacciones sucesivas en las cuales el producto de una es reactivo de otra, están acopladas. En este caso, el ΔG del proceso total es igual a la suma de los ΔG de las reacciones individuales. En transformaciones bioquímicas, las reacciones endergónicas son posibles gracias a su acoplamiento con otras reacciones suficientemente exergónicas, de modo que el ΔG total resulta negativo. ATP, compuesto "rico en energía", participa en reacciones acopladas; su $\Delta G°'$ de hidrólisis (–30,5 kJ/mol) hace del ATP un excelente mediador en transferencias de energía.

Cinética química. Desde el punto de vista cinético, las reacciones pueden clasificarse según la relación existente entre velocidad de reacción y concentración de reactivos. Una reacción es de orden cero cuando su velocidad es constante independientemente de la concentración de reactivo. Es de primer orden cuando la velocidad es directamente proporcional a la concentración de reactivo.

Se llama *energía de activación* la que debe suministrarse a los reactivos para que alcancen el estado de transición o estado activado, a partir del cual la reacción transcurre espontáneamente.

BIBLIOGRAFÍA

Alberty R.A. (1994). Biochemical thermodynamics. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1207: 1-11.
Hammes G.G. (2000). *Thermodynamics and Kinetics for the Biological Sciences*. John Wiley and Sons, Nueva York.
Haynied T. (2001). *Biological Thermodiynamics*, Cambridge University Press, Cambridge.
Newsholme E.A., Leech A.R. (1986). *Bioquímica Médica*, Interamericana, México.

CAPÍTULO 8

Enzimas

En todo ser vivo se producen constantemente innumerables reacciones químicas. Muchas de ellas transforman las sustancias que llegan con los alimentos, o aquellas que son endógenas al organismo, a fin de obtener energía y materia prima para la síntesis de nuevas estructuras moleculares. Dicha síntesis, así como la degradación de los componentes celulares que han cumplido su vida útil, son también resultado de múltiples reacciones.

La velocidad y eficiencia con las que se realizan las transformaciones bioquímicas son notables. Si se pretendiese repetirlas en el laboratorio, se comprobaría que sólo ocurren si se suministra calor, o pH extremos, o grandes presiones, etc., recursos todos incompatibles con la subsistencia de las células. En las condiciones reinantes en el organismo (temperatura de alrededor de 37°C en seres endotermos, temperatura ambiente en exotermos, pH próximo a la neutralidad, presión constante, etc.), la mayor parte de las reacciones transcurriría muy lentamente o no se produciría en absoluto. Sin embargo, las reacciones químicas se realizan en los seres vivientes a gran velocidad, en condiciones muy moderadas de temperatura, pH, presión, etc., gracias a la existencia de *catalizadores*.

Las enzimas son catalizadores biológicos

Un catalizador es un agente capaz de acelerar una reacción química, sin formar parte de los productos finales ni desgastarse en el proceso. En los medios biológicos se desempeñan como catalizadores macromoléculas denominadas *enzimas*.

Como todo catalizador, las enzimas actúan disminuyendo la energía de activación (E_a) (pág. 141) de una reacción. En este sentido, son más efectivas que la mayoría de catalizadores inorgánicos. Por otra parte, las enzimas muestran mayor especificidad. Los catalizadores inorgánicos suelen actuar acelerando reacciones químicas muy diversas, mientras las enzimas sólo catalizan una reacción química determinada. Algunas enzimas actúan sobre sustancias distintas, pero en general se trata de compuestos homólogos y la reacción catalizada es siempre del mismo tipo.

Las sustancias sobre las cuales actúan las enzimas reciben el nombre genérico de *sustratos*.

La especificidad de una enzima le permite distinguir con gran selectividad entre diferentes sustancias y aun entre isómeros ópticos. Por ejemplo, la glucoquinasa, enzima que cataliza una reacción de fosforilación de D-glucosa, no actúa frente a L-glucosa.

Nomenclatura y clasificación de enzimas

Las enzimas suelen designarse agregando el sufijo *asa* al nombre del sustrato sobre el cual actúan. Por ejemplo, amilasa, ureasa y tirosinasa son enzimas que catalizan reacciones con almidón, urea y tirosina respectivamente. También se denominan las enzimas según el tipo de reacción catalizada, por ejemplo, deshidrogenasas y descarboxilasas catalizan la sustracción de hidrógeno y carboxilo del sustrato respectivamente.

Por otra parte, ciertas enzimas conocidas desde hace mucho tiempo tienen nombres arbitrarios. Entre ellas, ptialina o amilasa salival, pepsina de jugo gástrico, tripsina y quimotripsina, proteasas de jugo pancreático.

La confusión creada por el uso de nombres según distintos criterios llevó a la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB en las siglas inglesas) a proponer un sistema de clasificación, con normas para asignar a cada enzima un nombre descriptivo y un número que permite ubicarla inequívocamente. En esta clasificación se consideran seis clases principales según el tipo de reacción catalizada. Las diversas reacciones bioquímicas pueden agruparse en esas seis categorías. Cada una de las clases se divide en subclases y subsubclases. El código numérico utilizado para identificar las enzimas consta de cuatro componentes: el primer número corresponde a la clase principal; el segundo, a la subclase, el tercero, a la subsubclase (estos números son asignados teniendo en cuenta la naturaleza de los grupos de átomos comprometidos en la reacción) y el cuarto es el número de orden de la enzima en su subsubclase. Periódicamente la IUBMB publica la nomenclatura de las enzimas conocidas. En ella se asigna el nombre sistemático, en el cual se mencionan sustratos utilizados y tipo de reacción catalizada; se indica también el nombre común o trivial más recomendable y se da el número de código. A fin de identificar con exactitud una enzima, debe consignarse ese número. En este texto se utilizará por lo general el nombre trivial recomendado por la IUBMB, salvo en algunos casos en los cuales el uso ha sancionado otra denominación.

Los seis grandes grupos de la clasificación internacional son:

1. **Oxidorreductasas.** Catalizan reacciones de oxidorreducción. Están asociadas a coenzimas (ver más adelante). Comprenden deshidrogenasas, oxidasas, peroxidasas y oxigenasas.

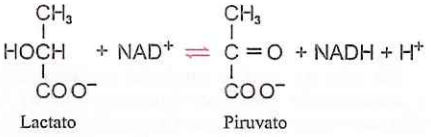
Deshidrogenasas. El sustrato es donante de hidrógenos, que son aceptados por la coenzima. Son designadas con el nombre del sustrato antepuesto a la palabra deshidrogenasa. Con menor frecuencia, cuando la reacción se indica en el sentido inverso, suele llamárselas *reductasas*.

Oxidasas. Enzimas que catalizan reacciones en las cuales el aceptor de hidrógeno es el oxígeno molecular (O_2), pero los átomos de oxígeno no aparecen en el producto oxidado.

Peroxidasas son las enzimas que utilizan H_2O_2 para oxidar el sustrato; el H_2O_2 se convierte en H_2O.

Oxigenasas. Incorporan oxígeno al sustrato. Se distinguen en *dioxigenasas* y *monooxigenasas*. Las primeras catalizan reacciones en las cuales los dos átomos del O_2 son recibidos por el sustrato. Las monooxigenasas incorporan al sustrato sólo uno de los átomos del O_2; el otro es reducido a H_2O. Requieren un cosustrato que provea átomos de hidrógeno. Comúnmente forman en el sustrato un grupo hidroxilo, razón por la cual se las llama también *hidroxilasas*. A este grupo pertenecen las oxigenasas u oxidasas de *función mixta*, así designadas para indicar que oxidan simultáneamente dos sustratos.

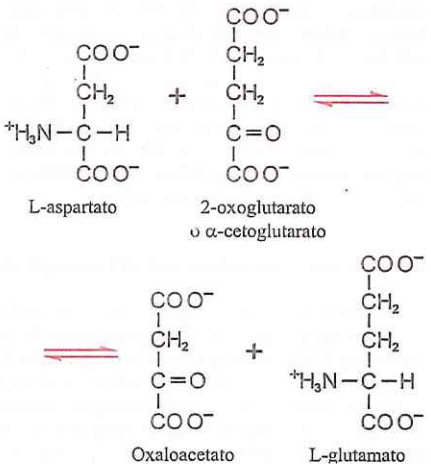
Como ejemplo de este grupo de enzimas citaremos la lactato deshidrogenasa, que cataliza la oxidación de lactato a piruvato y también la reacción inversa (reducción de piruvato a lactato). La enzima utiliza NAD como coenzima. La reacción catalizada es:



Lactato — Piruvato

El nombre sistemático es L-lactato: NAD oxidorreductasa; nombre trivial recomendado, lactato deshidrogenasa y número de código 1.1.1.27.

2. **Transferasas.** Catalizan la transferencia de un grupo de átomos, como amina, carboxilo, carbonilo, metilo, acilo, glicosilo, fosforilo, desde un sustrato considerado donante, a otro compuesto aceptor. Por ejemplo, aminotransferasas o transaminasas, que catalizan la cesión del grupo amina de un compuesto a otro. La reacción:

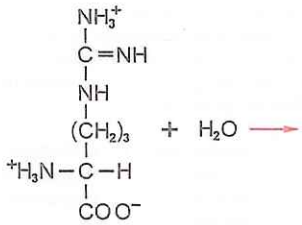


L-aspartato — 2-oxoglutarato o α-cetoglutarato

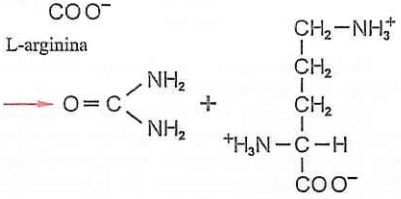
Oxaloacetato — L-glutamato

es catalizada por una enzima cuyo nombre sistemático es L-aspartato: 2-oxoglutarato aminotransferasa; nombre trivial recomendado, aspartato aminotransferasa y número de código, 2.6.1.1.

3. **Hidrolasas.** Catalizan la ruptura de enlaces C–O, C–N, C–S y O–P por adición de agua. El nombre recomendado se forma con el del sustrato y el sufijo *asa*. Pertenecen a este grupo acetilcolinesterasa y ribonucleasa, que hidrolizan la unión éster entre acetato y colina de acetilcolina y las uniones entre nucleótidos en ARN respectivamente. Otro ejemplo es la arginasa, que cataliza la hidrólisis de arginina para formar urea:



L-arginina

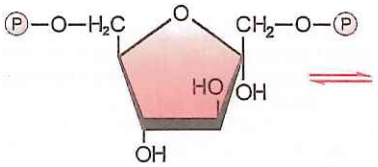


Urea L-ornitina

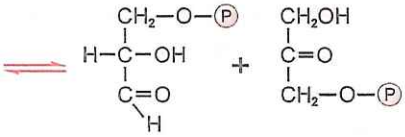
El nombre sistemático es L-arginina amidino hidrolasa; nombre trivial, arginasa y número de código, 3.5.3.1.

4. **Liasas.** Catalizan la ruptura de uniones C–C, C–S y C–N (excluyendo uniones peptídicas) de la molécula del sustrato, por un proceso distinto al de hidrólisis. Algunas eliminan grupos del sustrato y forman dobles ligaduras o ciclos, o agregan grupos a enlaces dobles. Los nombres recomendados incluyen, por ejemplo, los de *descarboxilasas*, *deshidratasas*, *aldolasas*, cuando eliminan CO_2, agua o aldehído respectivamente. En los casos en los cuales la reacción inversa (incorporación de un grupo) sea la más importante, se utiliza la denominación *sintasa* (no sintetasa), a fin de destacar la finalidad de síntesis de la reacción. Las sintasas no requieren nucleósidos trifosfato (ATP, GTP, etc.) como proveedores de energía en sus reacciones de condensación.

Un ejemplo de liasa es la aldolasa, que divide fructosa-1,6-bisfosfato en dos triosas fosfato.



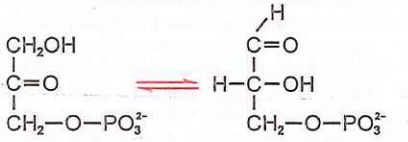
Fructosa-1,6-bisfosfato



D-gliceraldehído-3-fosfato Dihidroxiacetonafosfato

El nombre sistemático es fructosa-1,6-bisfosfato: D-gliceraldehído-3-fosfato liasa; nombre trivial recomendado, fructosa-bisfosfato aldolasa y número de código, 4.1.2.13.

5. **Isomerasas.** Interconvierten isómeros de cualquier tipo, ópticos, geométricos o de posición. Algunas de ellas reciben nombres triviales, como epimerasa, racemasa, cis-trans isomerasas, cicloisomerasas, tautomerasas. Ejemplos, fosfoglucoisomerasa, cataliza la interconversión glucosa-6-fosfato ⇌ fructosa-6-fosfato; o triosafosfato isomerasa, que cataliza la reacción:

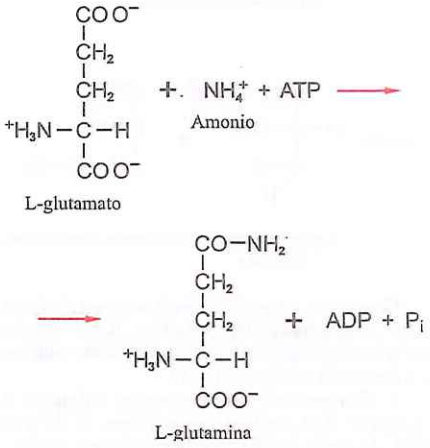


Dihidroxiacetonafosfato D-gliceraldehído-3-fosfato

El nombre sistemático es D-gliceraldehído-3-fosfato cetol isomerasa; nombre trivial recomendado, triosafosfato isomerasa; número de código, 5.3.1.1.

6. **Ligasas.** Catalizan la unión de dos moléculas, acoplada con la hidrólisis de un enlace de alta energía de nucleósidos trifosfato. En estas reacciones de condensación se forman uniones C–C, C–S, C–O o C–N. La designación *sintetasa*, que suele asignarse a estas enzimas, debe reservarse para las que responden estrictamente a la definición precedente; no confundir con *sintasa*. Para evitar errores, se recomienda llamar

ligasas a las enzimas de este grupo. Por ejemplo, la glutamato:amoníaco ligasa, número de código 6.3.1.2, también llamada glutamina sintetasa, actúa en la reacción entre ácido glutámico y amoníaco para formar glutamina. La energía necesaria para la síntesis es provista por hidrólisis de ATP:



Naturaleza química de las enzimas

En 1926, Sumner purificó y cristalizó por primera vez una enzima, *ureasa*, que cataliza la hidrólisis de urea a amoníaco y bióxido de carbono. Se comprobó entonces su naturaleza proteínica. Posteriormente se han obtenido muchas enzimas al estado puro y estudiado muy cuidadosamente su constitución. Como consecuencia de esos estudios, hasta hace pocos años estaba firmemente arraigado un concepto: todas las enzimas son proteínas. Sin embargo, se han aislado moléculas de ácido ribonucleico (ARN) con actividad catalítica, las llamadas *ribozimas* (pág. 446).

Las técnicas actualmente disponibles para el estudio de macromoléculas han permitido conocer con exactitud la estructura de numerosas enzimas y construir modelos precisos de las mismas. Este tipo de conocimiento arroja luz acerca del mecanismo de la acción enzimática.

Algunas enzimas están constituidas sólo por aminoácidos. Las hidrolasas, en general, son proteínas simples. Existen enzimas formadas por asociación de varias subunidades o cadenas polipeptídicas, es decir, son oligómeros. Frecuentemente las relaciones mutuas entre las subunidades constituyentes tienen importancia funcional.

Coenzima. Muchas enzimas sólo pueden realizar su función catalítica en asociación con otra molécula no proteica, de tamaño relativamente pequeño, denominada *coenzima*. Las coenzimas pueden estar firmemente unidas a la enzima por uniones covalentes u otro tipo de interacción fuerte, formando complejos difíciles de separar. Algunos autores prefieren llamar a éstas *grupo prostético* y reservar el nombre coenzima para aquellas cuya asociación a la proteína es más laxa. En este texto se utilizará el nombre coenzima, cualquiera sea el carácter de la unión a la enzima. Las dos porciones, proteica y no proteica, son indispensables para la actividad de la enzima. El sistema completo se llama *holoenzima* y está constituido por la proteína, designada *apoenzima* (macromolécula termolábil, no dializable), y la *coenzima* (molécula no proteica, termoestable, tamaño relativamente pequeño).

HOLOENZIMA	=	APOENZIMA	+	COENZIMA
Enzima total		Proteína		No proteínica
		Termolábil		Termoestable
		No dializa		

Oxidorreductasas, transferasas, isomerasas y ligasas requieren coenzimas.

Las coenzimas intervienen activamente en la reacción experimentando cambios que compensan las transformaciones sufridas por el sustrato. Por ejemplo, las coenzimas de oxidorreductasas aceptan o ceden los hidrógenos o electrones sustraídos o donados al sustrato. Las transferasas poseen coenzimas capaces de captar o ceder el grupo transferido en la reacción.

Muchas de las coenzimas presentan estructura de tipo nucleotídico. Por otra parte, las coenzimas están relacionadas con *vitaminas*, compuestos que el organismo no puede sintetizar y deben ser aportados por la alimentación. Las vitaminas pertenecientes al llamado grupo o "complejo" B forman parte de la estructura de coenzimas. Esta participación en procesos enzimáticos otorga a muchas vitaminas su importancia fisiológica. La tabla 8-1 presenta una lista de coenzimas e indica la vitamina relacionada. En el capítulo 27 se tratará el papel funcional de las vitaminas.

Si bien siempre participa en un determinado tipo de reacción, una coenzima puede unirse a distintas apoenzimas y actuar frente a diferentes sustratos. Por ejemplo, lactato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, glutamato deshidrogenasa y otras oxidorreductasas utilizan la misma coenzima, nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), aceptora de los hidrógenos sustraídos al sustrato. Es decir, no es la coenzima, sino la apoenzima, la

Tabla 8-1. Coenzimas.

Nombre	*Vitamina correspondiente*
Pirofosfato de tiamina	Tiamina
Fosfato de piridoxal	Piridoxina
Biotina	Biotina
Flavina adenina mononucleótido (FMN)	Riboflavina
Flavina adenina mononucleótido (FAD)	Riboflavina
Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD)	Niacinas
Nicotinamida adenina dinucleótidofosfato (NADP)	Niacina
Coenzima A	Ácido pantoténico
Ácido tetrahidrofólico	Ácido fólico
Coenzima B_{12}	Vitamina B_{12}

responsable de reconocer con precisión al sustrato. La especificidad de la holoenzima depende de la porción proteica.

Metaloenzimas

En algunas enzimas, la presencia de iones metálicos es indispensable para la acción catalítica. Los iones metálicos contribuyen al proceso catalítico por su capacidad para atraer o donar electrones. Algunos metales fijan ligandos a su esfera de coordinación, lo cual los habilita para unir sustratos. Otros contribuyen al mantenimiento de las estructuras terciaria y cuaternaria de la molécula de enzima. En todas las metaloenzimas, la eliminación del componente metálico determina pérdida de actividad. Los siguientes son ejemplos de este tipo de enzimas.

Fe. Catalasa, peroxidasas y citocromos son hemoproteínas en las cuales el hierro es esencial para la actividad enzimática.

Cu. Tirosinasa, ácido ascórbico oxidasa, citocromo oxidasa (que posee además Fe) contienen cobre.

Zn. Alcohol deshidrogenasa y anhidrasa carbónica son enzimas con zinc como parte integrante de su molécula.

Mo. Integra la molécula de xantino oxidasa (que también tiene Fe) y otras oxidasas y deshidrogenasas.

Mg: Es requerido por enzimas que usan ATP como cofactor. La forma activa de ATP es un complejo ATP-Mg^{2+}. El Mg^{2+} se une a los grupos fosfato con carga negativa en el ATP.

Mn. El manganeso es indispensable para la acción de acetil-CoA carboxilasa, desoxirribonucleasa y otras enzimas.

Se. El selenio se encuentra en la glutatión peroxidasa.

Ca. Muchas enzimas requieren ion Ca^{2+} o son activadas por él.

La actividad de algunas enzimas depende de la presencia de determinados iones en el medio, por ejemplo, cationes Na^+ y K^+, o aniones Cl^- (no metálicos).

Catálisis enzimática

Según se ha mencionado en el capítulo anterior, las enzimas aumentan la velocidad de reacción disminuyendo la energía de activación (E_a). De esta manera, mayor número de moléculas alcanzan el estado intermediario o de transición, y la transformación química se acelera. Las enzimas aumentan enormemente la velocidad de reacción y, como todo catalizador, no modifican en absoluto el cambio neto de energía, ni la constante de equilibrio.

Durante el curso de la reacción, la enzima se une efectivamente al o a los sustrato/s, formando un complejo transitorio. Las eventuales modificaciones de la molécula durante dicha unión son efímeras; la enzima aparece inalterada al final de la catálisis.

Si una enzima E cataliza la transformación del sustrato S en producto P, primero se unen enzima y sustrato para formar el complejo ES, el cual luego se disocia en enzima y producto. El proceso puede representarse con la ecuación:

$$\underset{\text{Enzima}}{E} + \underset{\text{Sustrato}}{S} \rightleftharpoons \underset{\substack{\text{Complejo}\\ \text{enzima-sustrato}}}{ES} \longrightarrow \underset{\text{Enzima}}{E} + \underset{\text{Producto}}{P}$$

La formación del complejo ES, inicialmente propuesta sobre bases teóricas, ha sido demostrada experimentalmente. En el transcurso de la reacción la enzima se une efectivamente al sustrato. Al final, la enzima no muestra cambio alguno y puede nuevamente unirse a otra molécula de sustrato. Ello explica por qué muy pequeñas cantidades de enzima aceleran enormemente la

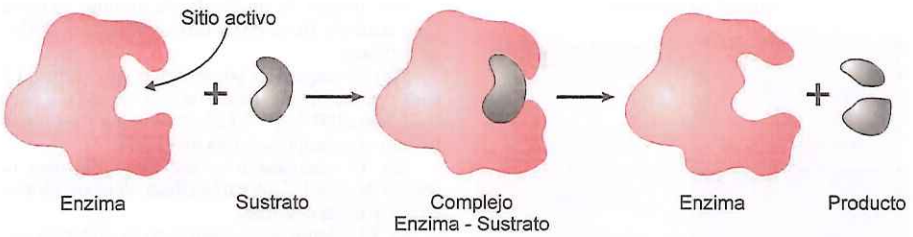


Fig. 8-1. Representación esquemática de una reacción enzimática.

velocidad de una reacción. La misma molécula es reutilizada muchísimas veces.

Sitio activo

Para formar el complejo ES, el sustrato se fija a un lugar definido de la enzima. Esta región de la molécula ha recibido las denominaciones de *sitio activo*, *centro activo*, *sitio catalítico* o *lugar de sustrato* y es donde se cumple la acción catalítica (fig. 8-1).

El lugar de sustrato posee sitios de unión y catalítico. Al fijarse al primero, el sustrato se dispone de manera tal que el enlace a ser modificado en la reacción se ubica exactamente en el sitio catalítico. Tanto la unión como la acción catalizadora exigen una conformación tridimensional altamente específica a nivel del sitio activo, en el cual las cadenas laterales de los restos aminoacídicos aportan grupos funcionales esenciales. Por ejemplo, cadenas laterales reactivas como las de cisteína, glutamato, aspartato, lisina, arginina, histidina, serina y treonina, o restos hidrofóbicos, suelen desempeñar un papel importante en la unión del sustrato.

El sitio activo es una agrupación de un número no muy grande de aminoácidos, distribuidos espacialmente de manera precisa. Esta disposición se mantiene gracias a la contribución de las estructuras (primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria) de la proteína. En la formación del sitio activo participan restos aminoacídicos situados a veces en posiciones distantes de la cadena polipeptídica, que convergen en una zona restringida y se ubican en posiciones espaciales adecuadas gracias a los plegamientos y torsiones de la cadena.

La importancia de determinados restos aminoacídicos como determinantes de la capacidad catalítica fue puesta de relieve por la observación de pacientes portadores de mutaciones que modifican la estructura primaria de una enzima (errores congénitos de metabolismo). En este campo, mucho se ha avanzado con técnicas de ingeniería genética que permiten cambiar selectivamente uno o más aminoácidos en la cadena de una proteína enzimática (mutagénesis dirigida).

La unión del sustrato a la enzima comprende la formación de interacciones no covalentes, tales como puentes de hidrógeno, enlaces iónicos e interacciones hidrofóbicas y de van der Waals. Los grupos químicos del sitio activo capaces de interactuar con el sustrato están dispuestos en el espacio de tal modo que enfrentan a los grupos correspondientes del sustrato específico y lo fijan en la posición apropiada. En el curso de la reacción también pueden formarse uniones covalentes transitorias entre enzima y sustrato.

La molécula de sustrato fijada a la enzima sufre una deformación en los enlaces que han de ser afectados por la reacción y adquiere un estado "tenso", desde el cual pasa fácilmente a formar el o los productos. Este estado de tensión o "activación" es el llamado *intermediario de transición* y explica por qué la enzima reduce la energía de activación.

Hasta aquí se ha hecho referencia a un sustrato. Sin embargo, en muchas reacciones químicas catalizadas por enzimas participan dos o más moléculas de sustratos diferentes. En estos casos, el sitio activo ofrece un nicho en el cual cada sustrato es ubicado en la posición y orientación más favorable para reaccionar; se promueve así la formación del estado de transición, la reducción de la energía de activación y el incremento de la velocidad de reacción.

Hay siempre una gran diferencia de tamaño entre la molécula de la enzima y la del sustrato. Aun cuando el sustrato sea una macromolécula, la zona de ésta que experimenta la acción de la enzima es un segmento pequeño. Por ello, muchos autores se han preguntado por qué a lo largo de la evolución se han seleccionado macromoléculas (ARN y proteínas) para cumplir el papel de enzimas y no moléculas más pequeñas, más "económicas" desde el punto de vista de su síntesis por la célula. La explicación más satisfactoria es la siguiente: con

moléculas pequeñas sería muy difícil obtener una configuración tridimensional adaptable a un determinado sustrato y crear un "nicho" precisamente conformado. Si bien el sitio activo es una porción reducida de la molécula, toda ésta colabora en mantener la disposición adecuada.

La coenzima también participa en asegurar la conformación óptima. Se une a la enzima en un lugar a ella destinado, generalmente próximo al sitio activo, y a veces forma parte del lugar del sustrato.

A fines del siglo XIX, E. Fischer emitió una hipótesis en la cual homologaba la unión del sustrato a la enzima con el encaje recíproco de la llave y la cerradura. Existiría complementariedad estructural para el ensamble preciso (fig. 8-2). Esta hipótesis explica los casos de enzimas con muy estricta especificidad, pero exige una rigidez no compatible con conocimientos actuales sobre estructura molecular y conformación de macromoléculas. Se conocen agentes que producen cambios conformacionales en la enzima y con ello aumentan la actividad catalítica. Actualmente tiene más aceptación la hipótesis de Koshland de *adaptación* o *ajuste inducido*, que considera a la enzima como una estructura dotada de plasticidad y flexibilidad. No se trata de un modelo rígido e inalterable, sino de una masa modificable en contacto con el sustrato, que se adapta a él, orientando los residuos esenciales en la posición óptima en el momento de formar el complejo ES. En este sentido, sólo el sustrato adecuado provoca en la enzima la disposición precisa de cadenas laterales necesaria para la catálisis. Cuando el sustrato se une a la enzima, induce cambios conformacionales en la molécula de ésta, y recién entonces se acomodan los grupos funcionales críticos para asegurar la ubicación más efectiva (fig. 8-3).

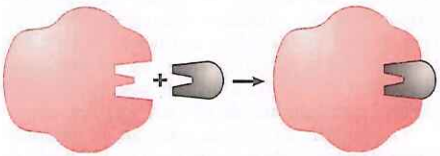


Fig. 8-2. Representación esquemática de la hipótesis "llave-cerradura" para la formación del complejo enzima-sustrato.

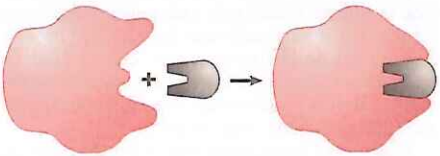


Fig. 8-3. Representación esquemática de la hipótesis de adaptación o "encaje inducido" para la formación del complejo enzima-sustrato.

Zimógenos

Algunas enzimas se sintetizan en las células de origen al estado de precursores inactivos llamados *zimógenos*, *proenzimas* o *preenzimas*. En la mayoría de los casos, estos precursores son proteínas simples que se convierten en enzima activa por un proceso de hidrólisis. Agentes específicos, frecuentemente enzimas hidrolíticas, producen ruptura de la cadena polipeptídica del zimógeno, cambian la conformación de la molécula y le otorgan actividad catalítica.

Son proenzimas algunos componentes de los jugos digestivos, secretados como zimógenos por las glándulas originarias y activados al llegar a la luz del tracto gastrointestinal (págs. 231, 234). Otras, presentes en plasma, son precursoras de enzimas proteolíticas que intervienen en el proceso de coagulación de la sangre (pág. 695).

Enzimas anormales por alteraciones genéticas

Dada la importancia de la estructura molecular para el correcto funcionamiento de las enzimas, toda alteración de la secuencia de aminoácidos que afecte restos esenciales, ya sea en el sitio activo o en posiciones críticas para el mantenimiento de su conformación, puede alterar su actividad.

Esta es la causa de gran número de enfermedades genéticas, conocidas con el nombre de *"errores congénitos de metabolismo"*. Defectos en el material genético determinan la síntesis de proteínas anormales que pueden resultar menos eficientes, totalmente inactivas o incapaces de responder a las demandas fisiológicas. Estas fallas ocasionan "bloqueos" en la vía metabólica de la cual la enzima afectada forma parte, produciendo trastornos, frecuentemente muy serios.

En los capítulos dedicados al estudio de metabolismo se mencionarán ejemplos de este tipo de enfermedades.

Distribución intracelular de enzimas

Una vez sintetizadas en las células, las enzimas son enviadas hacia el lugar en el cual han de cumplir su misión. Existen enzimas que actúan fuera de la célula que las produce, como las de

los jugos digestivos y las relacionadas con la coagulación de la sangre.

La enorme mayoría de las enzimas son intracelulares. No se encuentran distribuidas al azar, sino dispuestas en los distintos compartimientos celulares a fin de cumplir más eficazmente sus funciones.

La distribución intracelular de enzimas puede estudiarse después de separar fracciones celulares por centrifugación. La diferencia de densidad entre organelas determina su sedimentación a distintas fuerzas centrífugas. Es posible obtener fracciones constituidas predominantemente por núcleos, mitocondrias, lisosomas, membranas del retículo endoplásmico o componentes de la fase soluble o citosol, y en ellas determinar químicamente la presencia de enzimas. También se utilizan métodos histoquímicos, aplicando tinciones específicas para revelar la ubicación de enzimas en cortes de tejidos.

Estas técnicas han permitido comprobar, por ejemplo, que: a) muchas enzimas asociadas al núcleo participan en el mantenimiento y función del aparato genético; b) en mitocondrias se encuentran enzimas vinculadas a reacciones oxidativas proveedoras de energía; c) los lisosomas contienen hidrolasas cuyo pH óptimo es más ácido que el de otras enzimas en la célula; su función es degradar moléculas al finalizar su vida útil; d) los ribosomas poseen enzimas comprometidas en la síntesis de proteínas; e) la fracción microsomal, formada por fragmentos del retículo endoplásmico, contiene enzimas encargadas de la síntesis de lípidos complejos, del metabolismo e inactivación de sustancias extrañas ingresadas al organismo, etc.; f) en el complejo de Golgi, formado por sacos aplanados, se encuentran enzimas relacionadas con la síntesis de oligosacáridos y glicosilación de proteínas y lípidos; g) en el citosol se hallan enzimas de la glucólisis, principal vía de utilización de glucosa, de la biosíntesis de ácidos grasos y otras; h) la membrana plasmática contiene numerosas enzimas, muchas de ellas comprometidas en mecanismos de transporte.

Sistemas multienzimáticos

Las enzimas pueden encontrarse libres en el citosol, incluidas en organelas subcelulares o integradas en estructuras de membranas. En algunos casos, se forman complejos organizados, constituidos por varias enzimas diferentes cuyas acciones se complementan. Ellos son *sistemas multienzimáticos* ordenados de tal modo (generalmente en membranas), que el producto de la reacción catalizada por la primera enzima es recibido como sustrato por la segunda y así sucesivamente; las transformaciones se producen según la secuencia fijada por la disposición espacial de los catalizadores. Ejemplo de estos sistemas es el de transporte de electrones o "cadena respiratoria", asociada a membrana interna de mitocondrias (pág. 171).

También existen *enzimas multifuncionales*, así llamadas por presentar varios sitios catalíticos distintos en una misma cadena polipeptídica; ejemplo, ácido graso sintasa.

Determinación de actividad enzimática

La actividad de una enzima puede determinarse midiendo la cantidad de producto formado, o de sustrato consumido, en un tiempo dado, en una mezcla de todos los factores requeridos para la reacción.

La determinación guarda relación con la cantidad de enzima presente y no es significativamente influida por los cambios producidos en la mezcla durante la reacción, si se mide *velocidad inicial*, es decir, cuando la cantidad de sustrato utilizado es aún insignificante en relación con el total presente en la mezcla. Se acepta como velocidad inicial la determinada antes que el consumo de sustrato haya alcanzado el 20% del total originalmente presente, pero es preferible fijar un límite más bajo (alrededor del 5%).

Para definir la actividad de una preparación enzimática se utilizan en la práctica distintas expresiones. La cantidad de enzima se indica habitualmente en Unidades Internacionales (UI). Una unidad de cualquier enzima es la cantidad que cataliza la transformación de un micromol ($1\ \mu mol = 10^{-6}$ mol) de sustrato por minuto, bajo condiciones definidas de pH, temperatura, etc.

La cantidad de enzima presente en un determinado volumen de muestra o, en otros términos, la concentración de enzima, se expresa corrientemente en Unidades Internacionales por mL de preparación.

Actividad específica es una expresión que indica la pureza relativa de una preparación enzimática. Relaciona actividad enzimática, no con el volumen de la muestra, sino con el total de proteínas existentes en la misma. La actividad específica indica las unidades de enzima por mg de proteínas presentes en la muestra.

Cuando se tiene la enzima al estado puro, se puede expresar su actividad por mg de enzima y, si además se conoce su masa molecular, se puede calcular *actividad molar*, *constante catalítica* o

número de recambio (en inglés, *turnover number*), correspondiente al número de moléculas de sustrato convertidas en producto en la unidad de tiempo (segundo, minuto) por una molécula de enzima trabajando en condiciones de saturación de sustrato. Entre las enzimas con número de recambio más elevado se cuentan la catalasa, cuyo sustrato es H_2O_2, con una actividad molar de 40.000.000 por segundo, y la anhidrasa carbónica, que cataliza la reacción reversible entre dióxido de carbono y agua para formar ácido carbónico (400.000 por segundo).

Factores que modifican la actividad enzimática

A. **Concentración de enzima.** Cuando se determina la velocidad inicial de una reacción catalizada por una enzima a distintas concentraciones de ésta, en presencia de cantidades saturantes de sustrato y manteniendo constantes todos los otros factores en el medio de reacción, se puede establecer la relación entre cantidad de enzima y velocidad (equivalente a actividad enzimática). Esta relación se mantendrá si se determina realmente velocidad inicial. La reacción no debe prolongarse más allá del tiempo necesario para consumir 5% del sustrato originalmente presente.

Si los resultados se representan en un sistema de coordenadas (concentración de enzima en abscisas y velocidad, o actividad, en ordenadas), se obtiene el gráfico de la figura 8-4. Esta gráfica indica que la velocidad es directamente proporcional a la concentración de enzima. En esta proporcionalidad se basan los métodos utilizados comúnmente para determinar la cantidad de enzima presente en una muestra.

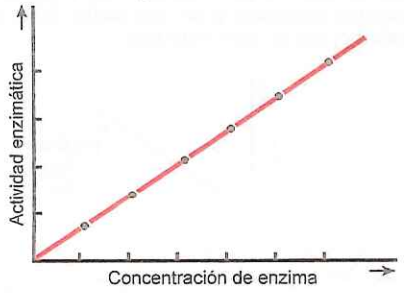


Fig. 8-4. Efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de reacción. En el eje de abscisas se representa la escala de concentraciones crecientes de enzima; sobre el eje de ordenadas, la velocidad inicial o actividad.

B. **Concentración de sustrato.** Si se efectúan determinaciones de actividad enzimática manteniendo constantes la concentración de enzima y las otras condiciones de la reacción, excepto concentración de sustrato y se representan los resultados en un sistema de coordenadas (concentración de sustrato en abscisas y velocidad de reacción o actividad enzimática en ordenadas), en la mayoría de los casos se obtiene una curva de tipo hiperbólico (fig. 8-5). Al comienzo, la actividad aumenta rápidamente con el incremento de concentración de sustrato [S], pero a niveles más elevados de ésta, la velocidad crece más lentamente, y tiende a alcanzar un máximo.

Cuando la concentración de sustrato es baja, la actividad crece en forma lineal con la concentración de sustrato. En este sector de la curva, la reacción es de primer orden, pues existe proporcionalidad entre velocidad de reacción y concentración de sustrato. A medida que aumenta ésta, los incrementos de velocidad son cada vez menores y se llega a una situación en la cual la actividad no aumenta por más que se eleve [S]. La curva tiende a la horizontal correspondiente a velocidad máxima (V_{max}). La curva hiperbólica es característica de reacciones en las cuales participa un sustrato. Cuando intervienen dos sustratos, puede obtenerse una curva hiperbólica para uno de ellos utilizando concentración constante y en franco exceso del otro.

Esta curva era conocida y analizada ya a comienzos del siglo XX; Michaelis y Menten (1913) derivaron de ella importantes conclusiones. En el caso más simple, la enzima se une al sustrato en

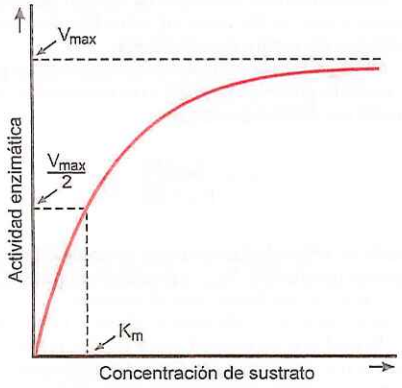


Fig. 8-5. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática. En el eje de abscisas se representa la escala de concentraciones de sustrato; sobre el de ordenadas, la velocidad inicial o actividad enzimática.

reacción reversible, muy rápida. El complejo formado se disocia en reacción más lenta que la primera y libera la enzima y el producto. El proceso se indica en la ecuación:

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$$

A concentraciones muy bajas de sustrato, gran parte de las moléculas de enzima se encuentra libre. Cuando aumenta el sustrato, mayor número de moléculas de enzima va siendo ocupado para formar ES. Si sigue creciendo [S], llega un momento en el cual prácticamente todas las moléculas de enzima están ocupadas por sustrato (recuérdese que [E] se mantiene constante), la enzima se ha "saturado" con sustrato. Si el aumento de [S] continúa y excede marcadamente a la de enzima, se alcanza un *estado estacionario* en el cual la velocidad de reacción no varía. Todo aumento ulterior de sustrato ya no puede producir incremento en la velocidad de reacción; ésta se comporta como de *orden cero*.

Teóricamente, la velocidad máxima sólo se alcanza a concentración infinita de sustrato; la curva no llega nunca a la horizontal correspondiente a V_{max} y no es posible predecir con exactitud la [S] a la cual será obtenida. Para establecer alguna relación precisa entre velocidad inicial y concentración de sustrato, Michaelis y Menten definieron una constante llamada K_m (constante de Michaelis).

La K_m corresponde a la concentración de sustrato con la cual la velocidad de reacción alcanza un valor igual a la mitad de la máxima.

En condiciones definidas de medio, pH, temperatura, etc., la K_m tiene un valor fijo para cada enzima y sirve para caracterizarla.

La hipérbola de saturación de una enzima por su sustrato puede expresarse con la ecuación deducida por Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V_{max}\,[S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

donde v: velocidad inicial con concentración de sustrato igual a [S]; V_{max}: velocidad máxima; K_m: constante de Michaelis para el sustrato.

A partir de esta ecuación se deduce que cuando [S] está por debajo del valor de K_m, la velocidad de reacción depende de la concentración de sustrato (porción inicial de la curva en la cual la reacción es de *primer orden* con respecto a [S]).

Cuando [S] es muy superior al valor de K_m, la velocidad inicial es prácticamente máxima (porción final de la curva, reacción de *orden cero*).

Si [S] es igual al valor de K_m, reemplazando en la ecuación (1):

$$v = \frac{V_{max}\,[S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{max}\,[S]}{[S] + [S]} = \frac{V_{max}\,[S]}{2\,[S]} = \frac{V_{max}}{2}$$

Es decir, cuando la concentración de sustrato es igual a la K_m, la velocidad de reacción es igual a la mitad de la máxima.

La ecuación de Michaelis-Menten puede ser transformada algebraicamente en ecuaciones equivalentes utilizables para la determinación práctica del valor de la K_m. Si tomamos la inversa de la ecuación (1):

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_{max}\,[S]} = \frac{K_m}{V_{max}\,[S]} + \frac{[S]}{V_{max}\,[S]} =$$

$$= \frac{K_m}{V_{max}}\,\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2)$$

Esta última ecuación, obtenida por transformación de la de Michaelis-Menten, es llamada de Lineweaver-Burk y corresponde a la ecuación de una recta.

La representación de la inversa de velocidad inicial (1/v) en función de la inversa de concentración de sustrato (1/[S]) da una recta (fig. 8-6). La pendiente de esta recta es igual a K_m/V_{max}, la intersección con el eje vertical corresponde a $1/V_{max}$ y la intersección con el eje horizontal tendrá el valor $-1/K_m$. En consecuencia, la representación de dobles recíprocas (1/v en función de 1/[S]) permite determinar los valores de V_{max} y K_m a partir de mediciones de actividad enzimática a varias concentraciones de sustrato. Existen otros métodos gráficos para calcular V_{max} y K_m, considerados superiores al de Lineweaver-Burk; sin embargo, éste se sigue utilizando.

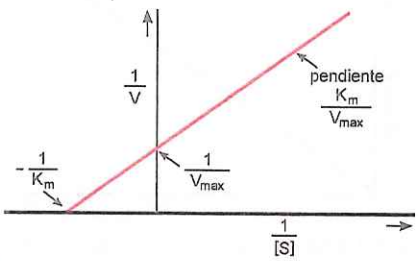


Fig. 8-6. Representación de dobles recíprocas (Lineweaver-Burk). No se representan los puntos experimentales, sino la línea que resulta de unir esos puntos.

Determinado en iguales condiciones de temperatura, pH, etc., el valor de K_m es característico para cada enzima y para cada uno de los sustratos que la misma utiliza. Los valores para distintas enzimas varían dentro de límites muy amplios; por ejemplo, la K_m de catalasa para el sustrato, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), es 25 mM, y la de hexoquinasa, enzima que cataliza la fosforilación de glucosa en el carbono 6, es 0,005 mM para D-glucosa.

En la mayoría de enzimas el valor de K_m guarda relación inversa con la afinidad de la enzima por el sustrato. En general, a mayor afinidad, menor valor de K_m.

Cuando una enzima actúa sobre varios sustratos homólogos, el valor de K_m suele ser diferente para cada uno de ellos. El sustrato con el cual se obtiene la K_m más pequeña es considerado el sustrato natural o "fisiológico" de la enzima.

C. **Temperatura.** Como consecuencia del incremento en energía cinética, la velocidad de una reacción química aumenta cuando la temperatura asciende. Dentro de ciertos límites, las reacciones catalizadas por enzimas siguen ese comportamiento. La velocidad de muchas reacciones biológicas prácticamente se duplica por cada 10°C de aumento de temperatura.

El incremento de la velocidad de reacción cada 10°C de aumento de la temperatura, es llamada Q_{10} o *coeficiente de temperatura*.

Si se mantienen constantes las concentraciones de enzima, sustrato y otros factores del medio de reacción y se determina actividad a temperaturas crecientes, los resultados representados en un sistema de coordenadas dan una curva del tipo indicado en la figura 8-7.

Si bien la actividad enzimática aumenta con la temperatura, se llega a un valor máximo, correspondiente a la temperatura óptima. Por encima de ese óptimo, la actividad cae rápidamente.

Para la gran mayoría de enzimas de animales endotermos, la temperatura óptima está alrededor de 37°C. La actividad disminuye bruscamente más allá de esa temperatura. Alrededor de los 60°C, la mayor parte de las enzimas son inactivadas completamente.

Este efecto inactivante de temperaturas superiores a 40°C se explica por la acción del calor sobre la estructura molecular. Las enzimas proteicas son desnaturalizadas por el aumento de temperatura.

D. **pH.** Si se mide actividad enzimática a diferentes pH, manteniendo constantes todos los otros factores, se puede demostrar el efecto de la concentración de hidrogeniones (fig. 8-8).

Para la mayoría de enzimas, la actividad óptima se encuentra entre pH 6 y 8. Por debajo o por encima de esos valores, la velocidad de reacción cae más o menos rápidamente. Sin embargo, hay algunas excepciones; por ejemplo, pepsina de jugo gástrico tiene un pH óptimo extremadamente ácido, alrededor de 1,5. Fosfatasa ácida, abundante en próstata, presenta su mayor actividad a pH 5 y fosfatasa alcalina de hueso y otros órganos alcanza máxima actividad a pH 9,5.

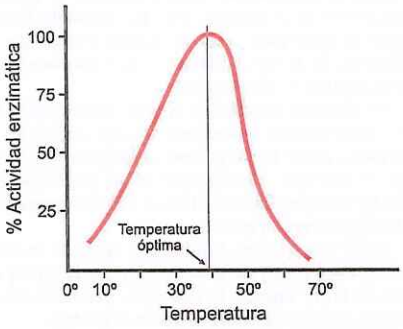


Fig. 8-7. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática. Las determinaciones se realizaron en cubetas termostatizadas a 5°, 10°, 15°, 20°, 25°, 30°, 35°, 40°, 45°, 50°, 55°, 60°, 65° y 70°C. La actividad enzimática, expresada como porcentaje de la actividad tomando como 100% la máxima alcanzada, se representa en el eje de las ordenadas; la temperatura a la cual se realizó la determinación, en el eje de las abscisas. No se representan los puntos experimentales, sino la curva que resulta de unir esos puntos.

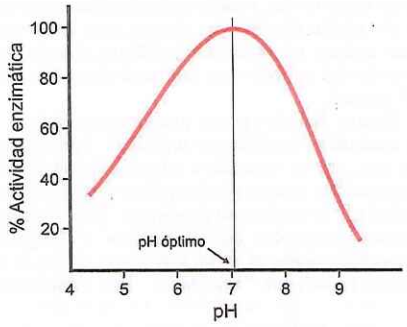


Fig. 8-8. Efecto del pH sobre la actividad enzimática. Las determinaciones se realizaron en mezclas con un pH de 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0 y 9,5. El pH se indica en el eje de abscisas. La actividad enzimática, expresada como porcentaje de la máxima alcanzada, se indica en ordenadas. No se representan los puntos experimentales, sino la curva que resulta de unir esos puntos.

Los cambios de pH del medio afectan el estado de ionización de grupos funcionales en la molécula de enzima y también en la de sustrato. Para la formación del complejo enzima-sustrato es necesaria una adecuada distribución de cargas en ambas moléculas. El pH óptimo es aquel en el cual el estado de ionización de los grupos esenciales es el más apropiado para interaccionar en el complejo ES.

Por otra parte, pH extremos provocan desnaturalización de la molécula enzimática, con la consiguiente inactivación.

Inhibidores enzimáticos

Existen agentes químicos que inhiben la acción catalítica de enzimas. Algunos de ellos ejercen su acción uniéndose a sitios o grupos funcionales esenciales de la molécula de enzima. Esas sustancias son de gran utilidad para estudiar algunos aspectos de la acción enzimática, principalmente los grupos funcionales que participan en la catálisis o son responsables de asegurar los requerimientos estructurales para la unión enzima-sustrato.

La inhibición puede ser reversible o irreversible.

Inhibidores irreversibles

Producen cambios permanentes en la molécula de enzima, con deterioro definitivo de su capacidad catalítica.

Como ejemplo de este tipo de inhibidores, citaremos los venenos organofosforados, utilizados como insecticidas. Producen inhibición irreversible de acetilcolinesterasa, enzima muy importante en sistema nervioso. La molécula alterada por la unión del inhibidor no recupera más su actividad normal.

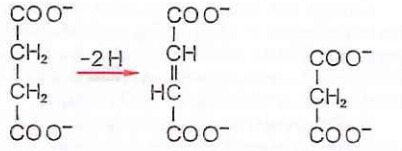
Dentro de este tipo de sustancias se incluye a los llamados *"inhibidores suicidas"*. Son sustancias que, por su semejanza estructural con el sustrato, pueden ocupar el sitio activo y ser transformados por la enzima en productos. Estos forman uniones covalentes con la enzima y bloquean irreversiblemente el sitio activo; es como si la enzima se hubiese "suicidado". Los inhibidores suicidas son muy específicos. Un ejemplo es el alopurinol, inhibidor de xantina oxidasa, utilizada en el tratamiento de la gota (pág. 372).

Inhibidores reversibles

Existen tres tipos de inhibición reversible: competitiva, no competitiva y anticompetitiva.

Inhibidores competitivos. Aumentan el valor de la constante de Michaelis (K_m), pero no modifican la velocidad máxima de la enzima. Estos efectos se alcanzan por diferentes mecanismos:

a) En algunos casos, el inhibidor presenta similitud estructural con el sustrato y ambos compiten por el sitio activo de la enzima. Un ejemplo de inhibición competitiva muy bien estudiado es el de la succinato deshidrogenasa por el malonato (forma ionizada del ácido malónico). La succinato deshidrogenasa cataliza la oxidación de succinato, el cual pierde dos hidrógenos para convertirse en fumarato:



Succinato	Fumarato	Malonato
Forma iónica del ácido succínico	Forma iónica del ácido fumárico	Forma iónica del ácido malónico

El ácido malónico tiene semejanza estructural con el ácido succínico; es también un ácido dicarboxílico de cadena lineal, pero con un carbono menos. En el centro activo de succinato deshidrogenasa existen grupos con carga positiva que atraen los carboxilatos del succinato. Otros diácidos con funciones $-COO^-$ separadas por una distancia adecuada, como es el caso del malonato y algunos otros ácidos dicarboxílicos, se fijan al sitio activo de la enzima. Esta no puede deshidrogenar al malonato, pues su cadena carbonada es diferente de la del succinato y por ello la acción de la enzima es bloqueada.

b) Algunas moléculas actúan como inhibidores competitivos uniéndose al sitio activo de la enzima a pesar de no poseer similitud estructural con el sustrato. Un ejemplo es el salicilato, inhibidor competitivo de alcohol deshidrogenasa y 3-fosfoglicerato quinasa.

c) En otros casos, inhibidor y sustrato se fijan a diferentes sitios de la enzima, pero la unión de uno de ellos impide la del otro, probablemente porque induce cambios conformacionales.

La inhibición de tipo competitivo puede ser revertida aumentando la concentración de sustrato. Si éste predomina en la mezcla, tiende a desplazar al inhibidor de su unión con la enzima.

El mecanismo de acción de un inhibidor se estudia mediante determinaciones de actividad enzimática a varias concentraciones de sustrato en ausencia y en presencia de una concentración fija de inhibidor. La representación gráfica

de los resultados permite establecer el tipo de inhibición.

La figura 8-9 A representa curvas de actividad frente a concentraciones crecientes de sustrato. La actividad es reducida por la presencia del inhibidor (I) a concentraciones bajas de sustrato, pero con concentraciones muy elevadas de éste se alcanza la misma velocidad máxima que con la enzima no inhibida, pues el sustrato desplaza al inhibidor del sitio activo. En la representación de dobles recíprocas (fig. 8-9 B), la recta correspondiente a valores obtenidos en presencia de inhibidor intersecta al eje vertical en el mismo punto que la recta de valores normales (en ausencia de I). La V_{max} es igual en ambos casos. En cambio, las intersecciones con el eje horizontal (valor $-1/K_m$) son diferentes, indican aumento de la K_m por acción del inhibidor.

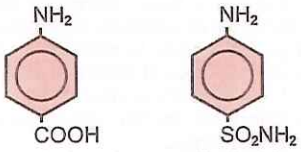
Como ambos se excluyen mutuamente, inhibidor y sustrato sólo pueden unirse con enzima libre. La enzima fijada a inhibidor es inactiva. En presencia de I se requieren concentraciones mayores de sustrato para obtener la misma velocidad que en ausencia del mismo. Hay una aparente disminución de afinidad de la enzima por el sustrato (aumento de K_m).

Las reacciones en presencia de un inhibidor competitivo pueden representarse del siguiente modo:

$$\begin{array}{l} E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P \\ + \\ I \\ \uparrow\downarrow \\ EI \end{array}$$

Los inhibidores competitivos tienen aplicación farmacológica. Algunos poderosos agentes quimioterápicos antibacterianos son inhibidores de este tipo.

Muchos microorganismos patógenos sintetizan ácido fólico, factor esencial para su desarrollo, a partir de ácido para-aminobenzoico (PABA). La sulfanilamida, un análogo estructural del ácido p-aminobenzoico, bloquea la síntesis de ácido fólico por inhibición competitiva de enzimas que utilizan PABA como sustrato. La deficiencia de ácido fólico resultante es fatal para la bacteria.



Ácido p-aminobenzoico Sulfanilamida

El ácido fólico es una vitamina del grupo B relacionada con factores comprometidos en importantes procesos metabólicos (pág. 600). En el ser humano es particularmente requerido por tejidos en activa división celular como el hematopoyético. También los tumores malignos, con gran actividad mitótica, necesitan esa sustancia. La administración de compuestos estructuralmente análogos al ácido fólico, inhibidores competitivos de los sistemas enzimáticos que utilizan ácido fólico, afecta particularmente a los tejidos más activos desde el punto de vista de la multiplicación celular. Este es el fundamento del uso de sustancias como ametopterina y aminopterina, denominados antifólicos, en el tratamiento de neoplasias.

Hay muchos ejemplos de este tipo de agentes utilizados con fines terapéuticos. También se los designa *antagonistas metabólicos*.

Inhibidores no competitivos. Se unen a la enzima en un lugar de la molécula diferente del

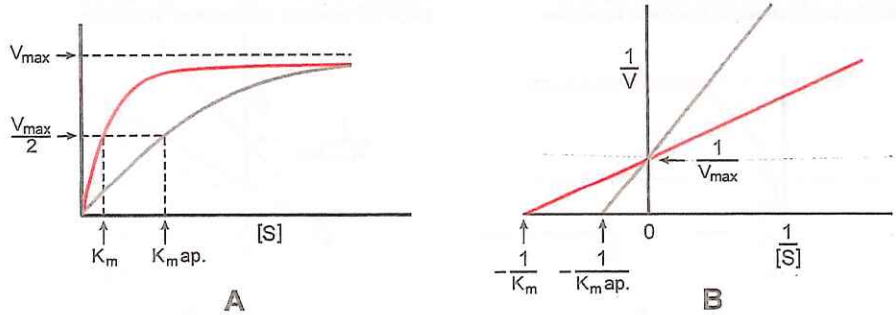


Fig. 8-9. Efecto de la presencia de un inhibidor *competitivo* sobre la actividad enzimática (línea roja, sin inhibidor; línea gris, con inhibidor. A. Curva de velocidad inicial en función de la concentración de sustrato. B. Representación de dobles recíprocas.

sitio activo y disminuyen la velocidad máxima sin modificar la constante de Michaelis o K_m.

Este tipo de inhibición no es revertida por aumento de la concentración de sustrato.

En presencia de inhibidor, la curva de velocidad inicial frente a concentración de sustrato (fig. 8-10 A) muestra menor actividad a todas las concentraciones de S. En la representación de dobles recíprocas (fig. 8-10 B), la intersección del eje vertical con la recta correspondiente a valores en presencia de inhibidor indica disminución de la V_{max}. En cambio, la intersección con el eje horizontal se hace en el mismo punto en los dos casos; el I no modifica el valor de K_m.

Las reacciones pueden representarse con las siguientes ecuaciones:

$$\begin{array}{ccccc} E + S & \rightleftharpoons & ES & \rightarrow & E + P \\ + & & + & & \\ I & & I & & \\ \downuparrows & & \downuparrows & & \\ EI + S & \rightleftharpoons & ESI & & \end{array}$$

La unión del sustrato con la enzima no está afectada; el inhibidor se une ya sea a la enzima libre o al complejo ES. Una vez formado el complejo ESI, la enzima se inactiva. El valor de K_m no se modifica, pues el sustrato reacciona con la enzima lo mismo que en ausencia de I. Pero la cantidad de ES con posibilidades de liberar producto se reduce y el resultado final es semejante al que se obtendría con menos enzima en el medio.

Pertenecen a esta categoría reactivos que se unen reversiblemente a grupos sulfhidrilos (–SH) de restos cisteína indispensables para la actividad de algunas enzimas. Iones metálicos, como Cu^{2+}, Hg^{2+} y Ag^{+} inhiben enzimas combinándose con grupos –SH. La unión del ion metálico provoca cambios conformacionales que inactivan la enzima.

Otros inhibidores se unen a metales componentes de la molécula de enzimas y producen su inhibición. Este es el mecanismo de acción del cianuro, poderoso veneno que se fija al Fe de citocromos, catalasas y peroxidasas y bloquea su actividad. El tetraacetato de etilendiamina (EDTA) es un agente "quelante" de cationes bivalentes; inhibe enzimas que requieren esos iones para su actividad.

A veces la situación es más compleja. El inhibidor modifica V_{max} y K_m, razón por la cual se habla de *inhibición mixta*.

Inhibidores anticompetitivos. Existe otro tipo de inhibidores reversibles, denominados anticompetitivos o acompetitivos. Las gráficas de actividad en función de [S] determinada en presencia y en ausencia de inhibidor muestran reducción de la velocidad a todas las concentraciones de S (fig. 8-11 A). La representación de los resultados por el método de dobles recíprocas da una línea paralela a la normal (fig. 8-11 B). La intersección con los ejes vertical y horizontal indica que el inhibidor produce disminución tanto de velocidad máxima como de K_m. El equilibrio puede representarse:

$$\begin{array}{ccccc} E + S & \rightleftharpoons & ES & \rightarrow & E + P \\ & & + & & \\ & & I & & \\ & & \downuparrows & & \\ & & ESI & & \end{array}$$

El inhibidor se une al complejo ES y forma el complejo inactivo ESI. Hay dos reacciones que consumen ES, una lleva a la formación de producto y otra a ESI, la reacción $E + S \rightleftharpoons ES$ es favorecida hacia la derecha; entonces parece como si hubiese aumento de la afinidad por el sustrato (reducción de K_m). La actividad es disminuida porque el complejo ES unido al inhibidor es inefectivo.

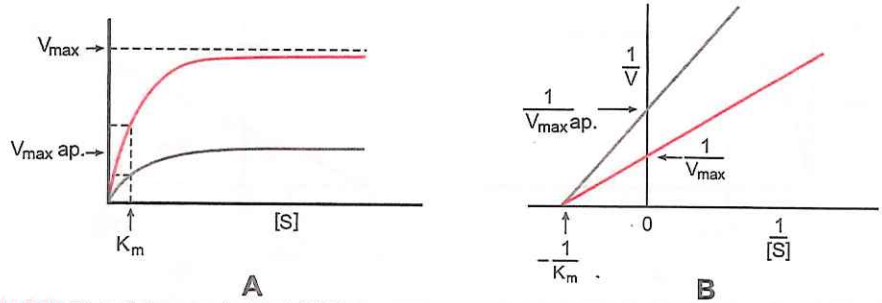


Fig. 8-10. Efecto de la presencia de un inhibidor no competitivo sobre la actividad enzimática (línea roja: sin inhibidor; línea gris: con inhibidor). **A.** Curva de velocidad inicial en función de la concentración de sustrato. **B.** Representación de dobles recíprocas.

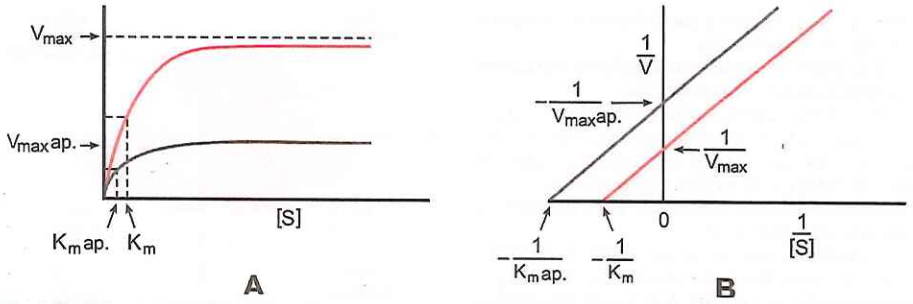


Fig. 8-11. Efecto de la presencia de un inhibidor *anticompetitivo* sobre la actividad enzimática (línea roja, sin inhibidor; línea gris, con inhibidor). A. Curva de velocidad inicial en función de la concentración de sustrato. B. Representación de dobles recíprocas.

Este tipo de inhibición se da en casos en los cuales participan varios sustratos en la reacción. No es revertida por aumento de [S].

Regulación de actividad enzimática

La actividad de enzimas en las células es ajustada a los requerimientos fisiológicos, cambiantes de momento a momento. Existen varios mecanismos de regulación.

Cuando la concentración de sustrato es baja, la actividad de la enzima es proporcional a los niveles de sustrato. En condiciones fisiológicas, las concentraciones de sustrato se encuentran por debajo o próximas a la K_m, de esta manera, los niveles de sustrato determinan la mayor o menor actividad enzimática. Al aumentar la concentración de sustrato, en la célula se acelera su utilización y viceversa.

Las transformaciones de un determinado compuesto en el organismo se producen generalmente a través de una serie de etapas, cada una de ellas catalizada por una enzima distinta. En cada paso se forma un nuevo producto, utilizado como sustrato por la enzima de la etapa siguiente. En casi todas estas secuencias de reacciones (vías metabólicas) existe una o más enzimas que actúan como reguladores del flujo de sustratos y productos, ajustándolo a las necesidades de la célula. Estas enzimas reguladoras no sólo cumplen su función catalizadora, sino aumentan o disminuyen su actividad en respuesta a señales específicas.

La enzima que cataliza la primera etapa en una vía metabólica suele ser reguladora. Las restantes enzimas de la serie ajustan su actividad a la disponibilidad de sustrato fijada a partir de la primera reacción.

De acuerdo con el tipo de señal a la cual responden, las enzimas reguladoras pueden distinguirse en *alostéricas* y *reguladas por modificación covalente*.

Enzimas alostéricas. En algunas vías metabólicas, la enzima que cataliza la primera etapa de la serie es inhibida por el producto de la última. Cuando la cantidad de ese producto final excede las necesidades, se frena el funcionamiento de la vía reduciendo la actividad de la enzima reguladora.

Se habla de inhibición por *retroalimentación* (del inglés *feedback*). Por ejemplo, aspartato transcarbamilasa, que cataliza la primera reacción en la biosíntesis de nucleótidos de pirimidina, es inhibida por citidina trifosfato (CTP), producto final de esa vía metabólica.

En otros casos, la enzima es estimulada por compuestos que se acumulan en el medio. El activador puede ser el propio sustrato de la enzima. Cuando existe exceso de sustrato, él mismo promueve su utilización activando la enzima.

Estas acciones, tanto de inhibición como de activación, son reversibles; al descender la concentración de la sustancia modificadora se normaliza la actividad de la enzima.

El agente modificador actúa uniéndose a la enzima en un lugar distinto al del sitio catalítico; de allí el nombre de *alostérico* de este tipo de regulación (del griego *allo*: otro, *stereo*: sitio o lugar).

En enzimas alostéricas, además del sitio catalítico, existen otros sitios reguladores a los cuales se unen específicamente las moléculas que actúan sobre su actividad catalítica. Estos agentes reciben el nombre de *moduladores*, *modificadores* o *efectores alostéricos*. Serán positivos si estimulan y negativos si deprimen la actividad de la enzima. Cuando el modulador alostérico es distinto del sustrato, el efecto es denominado *he-*

terotrópico; si el agente modificador es el mismo sustrato, es *homotrópico*.

Las enzimas alostéricas catalizan reacciones unidireccionales, no reversibles.

En algunos casos, varios moduladores actúan sobre una misma enzima, aun con efectos contrarios. Cada uno de los moduladores posee un sitio de unión a la enzima (sitio alostérico) con complementariedad estructural para asegurar la especificidad (fig. 8-12).

Cuando se analiza la actividad de enzimas frente a concentraciones crecientes de sustrato, generalmente se obtiene una curva hiperbólica (fig. 8-5). Esta es la cinética enzimática clásica, pero no es la correspondiente a enzimas alostéricas. Con ellas se obtiene una curva *sigmoide* (fig. 8-13), semejante a la de saturación de hemoglobina con oxígeno (pág. 54). La hemoglobina es un oligómero, con cuatro sitios de unión para el oxígeno y ofrece un modelo análogo al de enzimas alostéricas. En la hemoglobina, el bisfosfoglicerato se comporta como modulador alostérico negativo; el oxígeno, al unirse al primer hemo provoca una modificación conformacional que facilita la entrada de O_2 a los restantes sitios, produce un efecto cooperativo similar al del sustrato de enzimas alostéricas homotrópicas.

Las enzimas alostéricas, a semejanza de la hemoglobina, están constituidas por varias subunidades polipeptídicas, entre las cuales existe algún tipo de comunicación. Cuando un modulador se une a una subunidad, se produce un cambio conformacional que se transmite a las otras y modifica la aptitud del sitio activo para recibir al sustrato (fig. 8-14).

Modificación covalente. Hay también enzimas reguladas por adición o sustracción de grupos unidos covalentemente. Como ejemplo de este tipo se citará a la glucógeno fosforilasa, enzima que inicia la vía de degradación del glucógeno. Esta enzima se encuentra en estado de baja actividad, llamado fosforilasa *b*, la cual es convertida en fosforilasa *a*, activa, por adición de fosfato al hidroxilo de residuos serina en la molécula de enzima. La fosforilasa *a*, a su vez, es desactivada por eliminación de fosfato y revierte a fosforilasa *b*.

La regulación covalente se realiza en varias enzimas por un proceso de unión o eliminación de fosfatos similar al mencionado. Existen también enzimas cuya actividad es modulada por la inserción covalente de otros grupos.

Una misma enzima puede responder a más de un tipo de regulación. La fosforilasa, mencionada como ejemplo de regulación covalente, es también una enzima alostérica que responde a varios moduladores.

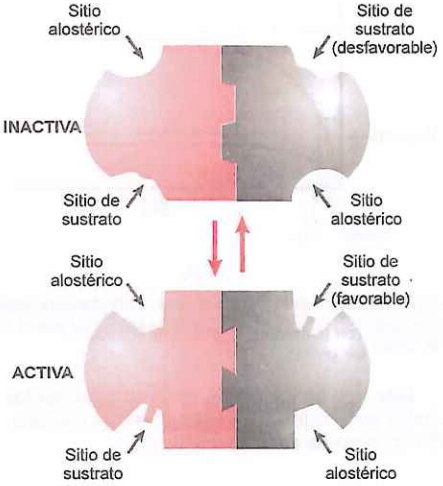


Fig. 8-12. Representación esquemática de una enzima alostérica. Se trata de un dímero que puede presentar una conformación inactiva y otra activa, que se encuentran en equilibrio. En la forma activa el sitio catalítico adquiere la forma favorable para la recepción del sustrato.

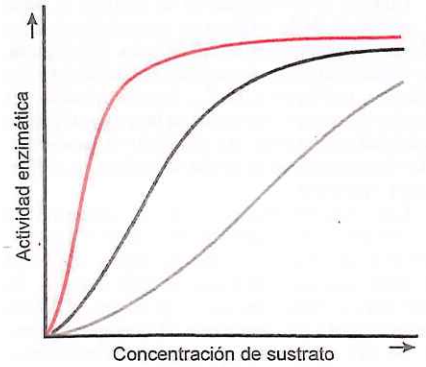


Fig. 8-13. Curva de actividad de una enzima alostérica en función de la concentración de sustrato: línea negra. Se muestra el efecto de la presencia en el medio de un modulador positivo (activador): línea roja, y de uno negativo (inhibidor): línea gris.

Enzimas constitutivas e inducibles

El nivel que alcanza una enzima determinada en las células depende de la relación entre su síntesis y su degradación. Cuando ambos procesos se man-

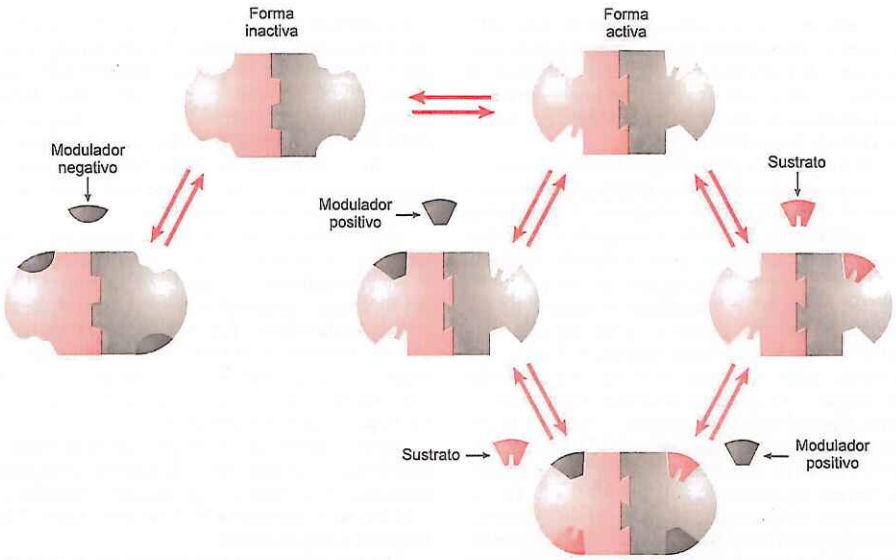


Fig. 8-14. Representación esquemática de interacciones alostéricas en una enzima dimérica. Los sitios del efector negativo y positivo se han dibujado arbitrariamente en la misma zona. A la izquierda, la unión del modulador negativo fija la enzima en la conformación desfavorable o inactiva. Al centro, la unión del modulador positivo promueve la conformación favorable para la recepción del sustrato. A la derecha, la entrada del sustrato en el sitio activo de uno de los monómeros puede también promover la conformación favorable en el otro sitio catalítico de la enzima (efecto homotrópico positivo). Las formas inactiva y activa están inicialmente en equilibrio. Si en el medio aumenta el efector positivo, o la concentración de sustrato, se favorece el desplazamiento del equilibrio hacia la conformación activa. Si en cambio se incrementa en el medio la concentración de modulador negativo, se promueve la conversión de moléculas de enzima en su conformación inactiva.

tienen más o menos constantes a todo lo largo de la vida de la célula, la cantidad de enzima permanece estable. Este es el caso de las enzimas *constitutivas*.

Para otras, en cambio, la síntesis se activa o deprime de acuerdo con los requerimientos de la célula en un momento dado. Por ejemplo, para algunas enzimas del metabolismo de glucosa y aminoácidos, la síntesis es estimulada cuando la presencia del sustrato respectivo las hace necesarias. Estas enzimas son *inducibles*. La inducción comprende síntesis *de novo* de la enzima y puede ser activada por hormonas (pág. 510).

Procesos enzimáticos en cascada

Participan en ellos una serie de zimógenos o proenzimas que se activan sucesivamente uno a otro en una cadena de reacciones.

Supongamos un sistema constituido por los zimógenos pro-A, pro-B y pro-C. Si un estímulo inicial provoca la activación de pro-A en enzima A, ésta utiliza como sustrato a pro-B para dar B, la cual a su vez cataliza la conversión de pro-C en C activa. En este ejemplo, si las tres enzimas A, B y C tuviesen una actividad molar de 100, una sola molécula inicial de A producirá en un minuto 100 moléculas de B, las cuales activarán 10.000 moléculas de C en el minuto siguiente. Como se trata de una progresión logarítmica, el resultado final es un incremento enorme de la actividad enzimática.

Veremos ejemplos de estas cascadas en procesos como la coagulación de la sangre, o en la transmisión de estímulos hormonales.

Los mecanismos regulatorios que comprenden efectos alostéricos, modificaciones covalentes y cascadas enzimáticas se ejercen sobre moléculas preexistentes y son de efecto muy rápido. En cambio, la inducción de enzimas exige síntesis de novo; es de respuesta más lenta.

Isozimas

En un organismo, y aun en una célula, pueden existir proteínas diferentes dotadas de la misma

actividad enzimática. Esas distintas formas moleculares de una enzima se denominan *isoenzimas*, *isozimas* o isoformas. El término isoformas se utiliza no sólo para enzimas, sino para variantes estructurales de una proteína cualquiera, capaces de cumplir funciones similares.

El método más utilizado para la demostración de isozimas es la electroforesis en geles seguida de tinción específica después de la separación. Las proteínas con actividad de la enzima investigada se muestran como bandas coloreadas sobre la superficie del gel.

Se ha probado la existencia de formas moleculares múltiples o isoenzimas en cientos de enzimas. Desde este punto de vista, ha sido muy estudiada la lactato deshidrogenasa (LDH), que presenta cinco isoformas en la mayoría de tejidos de animales. Se numeran de acuerdo con su movilidad electroforética, designando 1 (uno) a la que migra más hacia el ánodo (fig. 8-15). La distribución relativa de actividad enzimática entre las cinco formas es característica para cada tejido. En extractos de músculo diafragma se revelan las cinco isozimas con intensidad aproximadamente similar. En cambio, en corazón hay un franco predominio de las isozimas 1 y 2; en hígado y músculo voluntario, la fracción 5 es la más abundante (fig. 8-15).

Las cinco isoformas de LDH son tetrámeros formados por las asociaciones posibles de dos cadenas polipeptídicas diferentes, designadas A o M y B o H. La isozima 1 es homotetrámero de subunidades B (B_4) y la isozima 5 está constituida por cuatro cadenas A (A_4). Las restantes corresponden a las siguientes asociaciones: LDH 2 = A_1B_3; LDH 3 = A_2B_2 y LDH 4 = A_3B_1.

En testículo humano adulto existe una isoenzima adicional, cuya movilidad electroforética es intermedia con respecto a las de las fracciones 3 y 4 (señalada con X en la figura 8-16). Esta forma adicional originalmente fue designada isozima X, actualmente se prefiere llamarla LDH C_4. Es un homotetrámero formado por subunidades polipeptídicas C distintas de A y B. Aparece en testículos de muchas especies de mamíferos y aves en el momento de la maduración sexual y constituye en todas ellas la principal lactato deshidrogenasa de espermatozoides.

Aunque las seis formas moleculares son todas lactato deshidrogenasas, hay particularidades en el comportamiento de cada isozima, que confieren diferente capacidad funcional a las distintas formas moleculares. Por esta razón, la posibilidad de sintetizar distintas isoenzimas otorga al organismo gran flexibilidad fisiológica, ya que cada órgano produce las formas más aptas para sus requerimientos específicos.

Otras enzimas, por ejemplo aspartato aminotransferasa y malato deshidrogenasa, presentan isoformas con diferente ubicación intracelular. Una forma se encuentra libre en el citosol y otra asociada a mitocondrias.

Los conocimientos alcanzados en el área de las isozimas han resultado valiosos no sólo para enzimólogos, sino también para genetistas y biólogos generales. La determinación de formas moleculares de enzimas ha encontrado aplicación en el laboratorio clínico.

Determinación de enzimas en el laboratorio clínico

El laboratorio de bioquímica clínica utiliza frecuentemente, con fines diagnósticos, la determinación de enzimas en líquidos orgánicos o

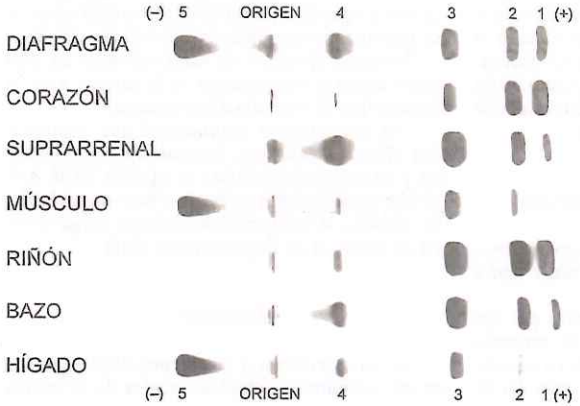


Fig. 8-15. Isozimas de lactato deshidrogenasa de extractos acuosos de tejidos humanos adultos, separadas mediante electroforesis en gel de almidón y teñidas con coloración específica. Las zonas en las cuales se deposita el colorante corresponden a las distintas formas moleculares de la enzima. *Origen* indica el lugar donde se insertó la muestra. Los números 1 a 5 señalan la ubicación de la isozima correspondiente. Nótese el predominio de isozimas 1 y 2 en corazón y de 5 en hígado y músculo.

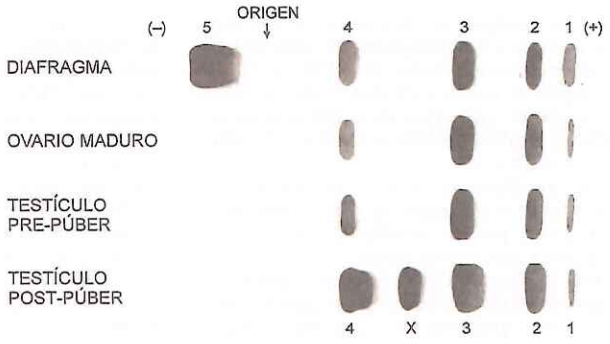


Fig. 8-16. Isozimas de lactato deshidrogenasa de extractos acuosos de tejidos humanos, separadas mediante electroforesis en gel de almidón y teñidas con coloración específica. *Origen* indica el lugar donde se insertó la muestra. Los números 1 a 5 señalan la ubicación de la isoforma correspondiente. Nótese la presencia de una banda adicional, entre las de isoenzimas 3 y 4, en testículo pospúber. Esa fracción corresponde a la isozima X o C4, específica de espermatozoides.

biopsias tisulares. Lo más común es realizar la investigación en plasma o suero sanguíneo, razón por la cual analizaremos brevemente el origen de enzimas en plasma.

Enzimas en plasma sanguíneo. Las enzimas existentes en plasma pueden ser específicas de éste o no. Las primeras cumplen su función en el plasma como ámbito normal de su acción. Entre estas enzimas se cuentan trombina y plasmina, comprometidas en los procesos de coagulación y fibrinólisis, ceruloplasmina o ferroxidasa, colinesterasa, etc. Son de interés clínico especialmente cuando su actividad está disminuida.

Las enzimas no específicas del plasma no tienen función definida en él. Normalmente su concentración es muy baja o nula. Dentro de esta clase se pueden distinguir enzimas extracelulares, normalmente producidas por glándulas de secreción externa, y enzimas intracelulares.

Las enzimas extracelulares o de secreción, como amilasa y lipasa pancreáticas y pepsinógeno (zimógeno de la pepsina gástrica), se encuentran en el plasma en muy bajas concentraciones. Aumentan en sangre por alteraciones que permiten pasaje desde la glándula de origen hacia el espacio intersticial; por ejemplo, obstrucciones del conducto pancreático o procesos inflamatorios serios del páncreas, provocan incremento del nivel de amilasa y lipasa en suero.

Las enzimas intracelulares participan en el metabolismo y se encuentran distribuidas en los distintos compartimientos de las células. La membrana plasmática normal no permite el paso de enzimas a su través; por lo tanto, éstas se mantienen dentro de la célula y sólo se encuentran cantidades muy reducidas en espacio intersticial y plasma sanguíneo. Una alteración muy intensa de la membrana puede determinar aparición de estas enzimas en plasma.

Si la célula es alterada por procesos inflamatorios serios o interrupción del suministro de oxígeno y nutrientes (falta de irrigación sanguínea), la membrana se deteriora. Los procesos más graves producen destrucción o necrosis celular. En estos casos el contenido de las células, incluidas las enzimas, es liberado al espacio intersticial y de allí llegan a la sangre. Cuando el número de células dañadas es grande, el nivel de enzimas en plasma aumenta marcadamente. Por ejemplo, en el infarto de miocardio, proceso en el cual un área del músculo cardíaco queda sin irrigación sanguínea, se produce destrucción de tejido y liberación de enzimas de las fibras miocárdicas lesionadas a la circulación. En plasma se detecta un brusco aumento de enzimas, particularmente aspartato aminotransferasa (también llamada glutámico-oxaloacético transaminasa), lactato deshidrogenasa y creatina quinasa, abundantes en miocardio. La magnitud y persistencia del incremento de esas enzimas en suero tienen valor diagnóstico y pronóstico en pacientes afectados de infarto. La troponina, proteína de músculo que no es una enzima, también es determinada en plasma para estimar el daño en miocardio. En enfermedades hepáticas acompañadas de alteraciones celulares, también se produce aumento de actividad de transaminasa y lactato deshidrogenasa en suero.

Si una enzima se encuentra predominantemente en un solo tejido u órgano (por ejemplo, alcohol y sorbitol deshidrogenasas en hígado, fosfatasa ácida en próstata), un aumento en su nivel plasmático indica inequívocamente el órgano de origen. En cambio, otras enzimas están distribuidas en muchos tejidos diferentes, razón por la cual su aumento en plasma no es índice seguro de daño en un tejido determinado. En estos casos, ayuda a identificar el origen de la enzima circulante la determinación de isoenzi-

mas. Por ejemplo, el incremento de isozima 1 (B_4) de lactato deshidrogenasa es característico de lesiones del miocardio, mientras en afecciones hepáticas aparece isozima 5 (A_4) en suero. El estudio de isoformas de creatina quinasa y fosfatasa alcalina también es útil para identificar el órgano afectado.

La investigación de isozimas puede servir para estimar la gravedad del daño celular en un determinado proceso patológico. En los casos de enzimas que poseen formas moleculares con distinta localización subcelular, por ejemplo aspartato aminotransferasa y otras transaminasas, malato deshidrogenasa, etc., la presencia en plasma de las isozimas citoplasmática y mitocondrial es un síntoma de gravedad, pues indica necrosis celular. Se las encuentra en infarto de miocardio y hepatitis muy serias. En procesos inflamatorios que no han llegado a la destrucción total de células pueden aparecer isoenzimas citosólicas, pero no es común encontrar formas mitocondriales en plasma.

Son numerosas las enfermedades en las cuales el incremento de enzimas en plasma es un síntoma utilizable para el diagnóstico y pronóstico. Una enumeración de las mismas estaría fuera del alcance de este texto.

En algunos casos resulta de utilidad la determinación de enzimas en otros líquidos biológicos, como orina y líquido cefalorraquídeo.

Existe un grupo de enfermedades producidas por incapacidad genética para sintetizar una enzima determinada. La investigación de actividad enzimática en biopsias de tejidos o células de la sangre certifica el diagnóstico y ayuda a detectar pacientes portadores de defectos de este tipo. La obtención de células fetales mediante amniocentesis permite hacer el diagnóstico prenatal.

No es posible aquí hacer consideraciones más extensas; sólo destacar la importancia que, desde el punto de vista del diagnóstico y pronóstico clínicos, ha adquirido la determinación de enzimas en distintos medios biológicos.

RESUMEN

Las reacciones químicas se realizan en los seres vivos a gran velocidad en condiciones muy moderadas de temperatura, pH, presión, etc., gracias a la existencia de catalizadores denominados *enzimas*. Las enzimas se caracterizan por su notable eficiencia y su extraordinaria especificidad. Las sustancias sobre las cuales actúan las enzimas se llaman *sustratos*. Se designan agregando el sufijo *asa* al nombre del sustrato (ureasa, tirosinasa) o al tipo de reacción catalizada (deshidrogenasa, descarboxilasa); algunas tienen nombres arbitrarios (pepsina, tripsina). El sistema de clasificación asigna a cada enzima un nombre y número para identificarla con seguridad. Se agrupan en seis categorías según el tipo de reacción catalizada: 1. Oxidorreductasas, 2. Transferasas, 3. Hidrolasas, 4. Liasas, 5. Isomerasas y 6. Ligasas. La gran mayoría de enzimas son proteínas; también existe ARN con actividad catalítica (ribozimas). Algunas enzimas son proteínas simples y otras, proteínas conjugadas asociadas con otra molécula no proteica, de pequeño tamaño, la *coenzima*. La porción proteica es la *apoenzima* y junto con la coenzima forman la *holoenzima*. La apoenzima es responsable de la especificidad de sustrato. Muchas de las coenzimas están relacionadas con vitaminas. Existen enzimas con iones metálicos en su molécula (metaloenzimas). *Mecanismo*. Las enzimas aumentan la velocidad de reacción disminuyendo la energía de activación. Durante el curso de la reacción, la enzima (E) se une al o a los sustrato/s (S) y forma un complejo enzima-sustrato (ES) transitorio. Al final de la reacción se forman productos, la enzima aparece inalterada y puede unirse nuevamente a otra molécula de sustrato. La misma molécula de E es reutilizada muchas veces. Para formar el complejo ES, S se fija en un lugar definido de E, el *sitio activo*. Existe complementariedad estructural entre E y S, lo cual permite un exacto encaje recíproco. En realidad, hay adaptación o *ajuste inducido*; la enzima se amolda al sustrato después de la unión de ambos. La conformación de la enzima, particularmente de su sitio activo, y la presencia en éste de grupos funcionales de cadenas laterales de restos aminoacídicos, aseguran la adecuada fijación del sustrato y la formación del *intermediario de transición*. Alteraciones de restos esenciales en el sitio activo o en posiciones críticas para el mantenimiento de su configuración, alteran la actividad.

Zimógenos o proenzimas son precursores inactivos de enzimas; adquieren actividad por hidrólisis de la cadena polipeptídica. Algunas enzimas cumplen su función fuera de las células, pero la mayoría son intracelulares, localizadas en distintos compartimientos según su función. A veces forman complejos constituidos por varias enzimas (*sistemas multienzimáticos*). Hay también *enzimas multifuncionales*; presentan varios sitios catalíticos distintos en una misma molécula.

Actividad. La actividad se determina midiendo cantidad de producto formado, o de sustrato consumido, en un tiempo dado. Se mide velocidad inicial cuando la cantidad de sustrato consumido es inferior al 20% del total originalmente presente. Una unidad internacional (UI) de enzima cataliza la transformación de un µmol de S por minuto bajo condiciones definidas de pH, temperatura, etc. *Actividad específica* expresa UI de enzima por mg de proteína en la muestra. *Actividad molar* o número de recambio es el número de moléculas de sustrato convertidas en producto en la unidad de tiempo por una molécula de enzima, en condiciones de saturación de sustrato. *Efecto de la cantidad de enzima*. La velocidad de una reacción catalizada es directamente proporcional a la cantidad de enzima presente. *Efecto de cantidad de sustrato*. Si se determina actividad manteniendo constantes [E] y las otras condiciones del

medio, excepto [S], a bajas [S] la actividad aumenta rápidamente con el incremento de [S]. A niveles más elevados, el aumento de velocidad se hace más lento y tiende a alcanzar un máximo, del cual no pasa aunque ascienda [S]. Se tiene una curva hiperbólica. A bajas [S] la reacción es de primer orden; a elevadas [S] la curva tiende a la horizontal, la reacción es de orden cero con respecto al sustrato. Constante de Michaelis o K_m es la [S] con la cual la velocidad de reacción alcanza un valor igual a la mitad de la máxima. En condiciones definidas de medio, pH, temperatura, etc., la K_m tiene valor fijo para cada enzima y sirve para caracterizarla. En la mayoría de enzimas, el valor K_m tiene relación inversa con la afinidad de la enzima por el sustrato; a mayor afinidad, menor K_m. *Efecto de temperatura*. La actividad enzimática aumenta con la temperatura hasta un máximo correspondiente al óptimo. Por encima de éste la actividad cae rápidamente. Para la mayoría de enzimas, la temperatura óptima está alrededor de 37°C. El efecto inactivante de temperaturas superiores a 40°C es debido a desnaturalización de la proteína. *Efecto de pH*. La velocidad cae por encima y debajo del pH óptimo. El pH influye el estado de disociación de grupos funcionales comprometidos en la formación del complejo ES. Además, a pH extremos se produce desnaturalización de la enzima. *Inhibidores. Irreversibles*: inhabilitan definitivamente a la enzima, entre ellos los "suicidas". *Reversibles*: a) Competitivos, aumentan la K_m pero no la V_{max}; su acción se revierte por aumento de [S]. Algunos presentan similitud estructural con el sustrato y compiten con éste por ocupar el sitio activo. b) No competitivos, se unen a la enzima en un sitio distinto al catalítico; disminuyen V_{max} sin modificar la K_m. No es influido por [S]. c) Anticompetitivos, reducen K_m y V_{max}.

Regulación de enzimas. La actividad es ajustada a los requerimientos por diversos mecanismos. La [S] en las células está por debajo de la K_m; en esos niveles, los cambios en [S] modifican la actividad. Comúnmente la enzima de la primera etapa de una vía metabólica es regulatoria. Enzimas *alostéricas* son moduladas por agentes que se unen a ellas en un lugar distinto al sitio activo. Son oligoméricas. La gráfica de velocidad inicial en función de [S] para enzimas alostéricas es sigmoide, no hiperbólica. También se modifica la actividad enzimática por *modificación covalente*; ejemplo: adición de fosfato a la molécula. *Enzimas constitutivas*. Se mantienen niveles constantes durante toda la vida de la célula. *Enzimas inducibles*. Su síntesis es activada según los requerimientos. *Procesos enzimáticos en cascada*. Una serie de zimógenos se activan en una cadena de reacciones. Tienen gran efecto amplificador. *Isozimas*. En un mismo organismo existen diferentes proteínas con igual actividad enzimática.

BIBLIOGRAFÍA

Blanco A. (1991). Functional Significance of the testis and sperm-specific lactate dehydrogenase isozyme (LDH C_4). *Miscelánea N° 84*, Academia Nacional de Ciencias, Córdoba.

Christensen H.N., Palmer G.A. (1980). *Cinética Enzimática. Curso programado para estudiantes de medicina y ciencias biológicas*, Edit. Reverté, Barcelona.

Cornish-Bowden A. (1995). *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. Portland Press, Londres.

Frey P.A., Hegeman A.D. (2006). *Enzymatic Reaction Mechanisms*. Oxford University Press, Nueva York.

Lilley D.M. (2003). The origins of RNA catalysis in ribozymes. *Trends in Biochemical Sciences*, 28: 495-501.

CAPÍTULO 9

Oxidaciones biológicas. Bioenergética

Las actividades de los seres vivientes requieren continuo aporte de energía. La síntesis de componentes celulares, el transporte activo de solutos a través de membranas contra gradientes de concentración, la contracción muscular, el movimiento de cilias y flagelos, sólo pueden llevarse a cabo si el suministro de energía es el necesario.

En primera instancia, la energía para los procesos biológicos procede del sol. La energía lumínica es captada por pigmentos existentes en los vegetales y en algunos microorganismos y transformada, mediante la *fotosíntesis*, en otras formas de energía, principalmente química, utilizable para la síntesis de sus propios componentes (hidratos de carbono, lípidos, proteínas, etc.), a partir de sustancias muy simples del medio (CO_2, H_2O, N_2, NH_3, NO_3^-). Estos organismos son llamados *fotótrofos*.

El resto de los seres vivos necesita incorporar moléculas complejas ya elaboradas. Estos organismos se denominan *quimiótrofos*, pues utilizan la energía química contenida en esas moléculas.

Por ejemplo, la glucosa es sintetizada por organismos fotótrofos a partir de CO_2 y H_2O. La reacción global de la fotosíntesis puede expresarse mediante la ecuación:

$$6 \text{ moles } CO_2 + 6 \text{ moles } H_2O + 686 \text{ kcal} \rightarrow 1 \text{ mol } C_6H_{12}O_6 + 6 \text{ moles } O_2$$

El dióxido de carbono y el agua se transforman en un compuesto de mayor contenido energético, la glucosa. Las 686 kcal (2870 kJ) necesarias para sintetizar una molécula gramo de la hexosa (180 g) son provistos por la radiación solar. En un mol de glucosa se incorporan 686 kcal, que pueden ser aprovechadas por organismos capaces de degradar la glucosa y de utilizar la energía liberada en el proceso.

El ATP es el principal intermediario de alto contenido energético

Tanto la transformación de la energía lumínica en seres fotótrofos, como el aprovechamiento de la energía química en los quimiótrofos, exige la formación de compuestos intermediarios especiales, de alto contenido energético, los cuales actúan como reservorios y transportadores de la energía a utilizar en la realización de trabajo (químico, osmótico, mecánico, etc.) en la célula. En todos los seres vivientes, el principal compuesto intermediario rico en energía es *adenosina trifosfato* (ATP) (fig. 9-1).

Los organismos aerobios, que requieren oxígeno para subsistir, alcanzan la mayor eficiencia en el aprovechamiento de la energía contenida en las moléculas aportadas por los alimentos. La oxidación de esas moléculas constituye el principal mecanismo para liberar esa energía. En el

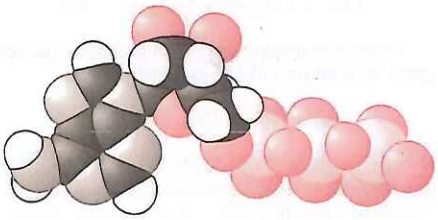


Fig. 9-1. Modelo molecular compacto de adenosina trifosfato (ATP). C: negro; N: gris; H: blanco; O: rojo; P: rosado.

caso de la glucosa, su oxidación completa en el organismo da los mismos productos finales que su combustión en el laboratorio:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \rightarrow 6\,CO_2 + 6\,H_2O$$

Esta reacción es fuertemente exergónica ($\Delta G^\circ = -686$ kcal/mol o -2870 kJ/mol).

Cuando la combustión se efectúa en una sola etapa, hay liberación brusca de energía en forma de calor. Obviamente, la oxidación de la glucosa no puede realizarse de este modo en las células, pues la elevación térmica resultante sería incompatible con su subsistencia y, por otra parte, aun cuando resistieran el aumento de temperatura, esa forma de energía no puede ser utilizada por las células para efectuar trabajo alguno. Sin embargo, la oxidación de la glucosa y de otras sustancias proveedoras de energía se realiza en el organismo en una serie de etapas ordenadas de manera tal que la energía se libera gradualmente, en condiciones que permiten su captación y utilización con gran eficiencia.

Como en los seres aerobios las oxidaciones son la principal fuente de energía, es conveniente incluir aquí algunos conceptos básicos sobre el tema.

OXIDACIÓN-REDUCCIÓN

Concepto de oxidación y reducción

Inicialmente se entendía por *oxidación* exclusivamente la combinación de un elemento o compuesto con oxígeno. El fenómeno inverso, es decir, la pérdida de oxígeno por parte de un compuesto, era llamado *reducción*.

Un trozo de hierro dejado a la intemperie reacciona lentamente con el oxígeno del aire y forma óxido férrico. Se dice que el hierro se ha oxidado; la reacción puede representarse:

$$4\,Fe + 3\,O_2 \rightarrow 2\,Fe_2O_3 \qquad (1)$$

Cuando se quema carbón en presencia de oxígeno, se produce anhídrido carbónico:

$$C + O_2 \rightarrow CO_2 \qquad (2)$$

el carbono se ha oxidado. Este tipo de proceso, que transcurre rápidamente, con gran desprendimiento de energía (calor y luz), recibe el nombre de combustión.

El óxido cuproso, en presencia de oxígeno, se convierte en óxido cúprico:

$$2\,Cu_2O + O_2 \rightarrow 4\,CuO \qquad (3)$$

La relación Cu/O en el óxido cuproso es de 2/1; en el óxido cúprico, de 1/1. El segundo compuesto posee, con relación al Cu, proporcionalmente más oxígeno que el primero; vale decir, el cobre se ha oxidado.

La reducción, proceso inverso a la oxidación, se consideraba equivalente a la pérdida o disminución del contenido de oxígeno de un compuesto. Por ejemplo, el óxido férrico, en presencia de hidrógeno, forma hierro libre y agua:

$$Fe_2O_3 + 3\,H_2 \rightarrow 2\,Fe + 3\,H_2O \qquad (4)$$

El hierro ha perdido el oxígeno al cual estaba unido en el óxido férrico; por lo tanto, se ha reducido.

Nuevos aportes experimentales obligaron a extender el concepto de oxidación. Se comprobó que un elemento o compuesto también podía alcanzar el estado considerado como "oxidado", no sólo por adición de oxígeno, sino por sustracción de hidrógeno:

$$3\,H_2S + 2\,HNO_3 \rightarrow 3\,S + 2\,NO + 4\,H_2O \qquad (5)$$

En esta reacción, el azufre del sulfuro de hidrógeno, al convertirse en azufre libre, no ha ganado oxígeno; ha perdido hidrógeno. Ello equivale a oxidación. Por otra parte, puede reducirse un compuesto por adición de hidrógeno.

Oxidación implica pérdida de electrones

Si se analizan los ejemplos precedentes desde el punto de vista de los intercambios electrónicos entre los elementos participantes, se tiene:

Reacción (1): El oxígeno posee seis electrones en su nivel de máxima energía. Para conseguir la configuración estable necesita ganar dos electrones. El hierro puede ceder dos o tres electrones en sus combinaciones; en el óxido férrico, el hierro "cede" tres electrones que son captados por átomos de oxígeno, más electronegativo que él.

Reacción (2): Cuando el carbono se oxida a dióxido de carbono, se establecen enlaces covalentes polares. En estos enlaces los electrones están más próximos al oxígeno, más electronegativo que el carbono. Hay transferencia relativa de electrones del carbono a los oxígenos.

Reacción (3): El cobre en el óxido cuproso se une al oxígeno por un enlace covalente polar simple en el cual el par electrónico está más próximo al oxígeno; el cobre ha "cedido" un

electrón al oxígeno. En el óxido cúprico, el átomo de cobre cede dos electrones al oxígeno. Al pasar de cuproso a cúprico, el cobre ha perdido un electrón más.

Reacción (4): El hierro del óxido férrico "cede" tres electrones a los oxígenos a los cuales se une; al reducirse y transformarse en hierro libre, recupera esos tres electrones.

Reacción (5): En el sulfuro de hidrógeno el azufre está unido al hidrógeno por enlaces covalentes polares en los cuales los electrones son atraídos hacia el azufre. Al convertirse en azufre libre, éste pierde esos electrones.

En todos los casos expuestos se comprueban cambios electrónicos de los elementos oxidados o reducidos que se pueden generalizar del siguiente modo: todos los elementos que se oxidan pierden o ceden electrones; los elementos que se reducen ganan electrones. De esto surge una nueva definición de los procesos de oxidación y reducción.

La oxidación implica una pérdida total o parcial de electrones, mientras la reducción implica ganancia de electrones.

Si se hace reaccionar hierro y cloro, se puede obtener cloruro férrico:

$$2\,Fe + 3\,Cl_2 \rightarrow 2\,FeCl_3$$

En este caso se forma un compuesto con enlaces iónicos. El hierro cede tres electrones y se convierte en ion férrico; los tres electrones perdidos por el metal son captados por sendos átomos de cloro, que se transforman en iones cloruro. El hierro se ha oxidado y el cloro se ha reducido. He aquí un ejemplo de oxidación y reducción que transcurre sin participación de oxígeno ni de hidrógeno. Sólo hay transferencia de electrones desde un elemento a otro. Conviene destacar que oxidación y reducción siempre van acopladas, pues en toda reacción en la cual un elemento se oxida, simultáneamente hay otro que se reduce. Los electrones cedidos por un elemento deben necesariamente ser captados por otro, pues los electrones no pueden quedar libres. Por ello se habla de reacciones de oxidorreducción o *redox*.

En una reacción *redox*, el elemento oxidado es el agente reductor y el reducido, el oxidante.

Potencial de reducción

Si en un tubo de ensayo se coloca solución de sulfato cúprico (de color azul) con un trozo de zinc metálico y se calienta suavemente, la solución pierde su color azul, se forma sulfato de zinc y un depósito de cobre metálico.

$$CuSO_4 + Zn \rightarrow ZnSO_4 + Cu$$

El Cu se encuentra oxidado en el sulfato cúprico (como catión Cu^{2+}). Al pasar a cobre metálico, recupera dos electrones; se ha reducido con respecto a su estado anterior. Por su parte, el zinc metálico, al desplazar al Cu^{2+} de su unión con sulfato, pierde dos electrones, es decir, se oxida.

La reacción inversa no se produce; el cobre es incapaz de ceder electrones al catión zinc y desplazarlo de sus combinaciones. Los electrones sólo pueden fluir de un elemento a otro si el primero tiene mayor tendencia a cederlos que el segundo.

La capacidad de una sustancia o elemento para oxidar a otra/o y, por lo tanto, para reducirse, depende de su avidez por aceptar electrones, que se expresa cuantitativamente por el llamado *potencial de reducción*.

En el ejemplo anterior el cobre demuestra poseer mayor potencial de reducción que el zinc, ya que los electrones pueden pasar desde el Zn al Cu^{2+}, pero no a la inversa.

Potencial de reducción (E) de un elemento, ion o compuesto, es su tendencia a ganar electrones frente a otro elemento, ion o compuesto.

Semirreacción. Una reacción redox puede ser considerada como la suma de dos medias reacciones o semirreacciones, en una de las cuales se representa sólo la oxidación y en la otra, la reducción.

Por ejemplo, en la ecuación $2\,Na + Cl_2 \rightarrow 2\,NaCl$, el sodio se oxida, pierde un electrón, mientras el cloro se reduce, gana un electrón. Las semirreacciones correspondientes son:

$$\textit{Oxidación:}\quad 2\,Na \rightarrow 2\,Na^+ + 2\,e^-$$
$$\textit{Reducción:}\quad Cl_2 + 2\,e^- \rightarrow 2\,Cl^-$$

Por convención, las reacciones redox se escriben en el sentido de reducción.

Las formas oxidada y reducida (Na^+–Na, Cl–Cl^-) en cada una de estas reacciones constituyen un par o cupla redox (Na^+/Na, Cl/Cl^-).

Determinación del potencial de reducción

Para conocer cuál de dos oxidantes es más fuerte y en qué dirección marchará la reacción cuando ambos se pongan en contacto, se recurre

a la medición del potencial de reducción, basada en el principio de las pilas electroquímicas.

Pilas electroquímicas. Si se coloca un trozo de zinc dentro de una solución de sulfato cúprico, se produce una reacción de oxidorreducción, simplificada en la ecuación:

$$Cu^{2+} + Zn \rightarrow Zn^{2+} + Cu$$

La misma reacción se produce, aun cuando los reactivos estén separados, en una pila electroquímica como la representada en la figura 9-2. En la cubeta de la izquierda, llena de solución de sulfato de zinc, se introduce una barra de zinc puro; en la otra cubeta, una barra de cobre se sumerge en solución de sulfato cúprico. Ambos recipientes están comunicados por un tubo lleno de solución de KCl (puente salino). Si se conectan las dos barras metálicas (electrodos) mediante un cable conductor provisto de un voltímetro, se constata una diferencia de potencial entre ambas. Fluyen electrones desde la cubeta con la barra de zinc hacia la del electrodo de cobre. El conjunto funciona como una pila y cada recipiente con su electrodo constituye una hemipila. El flujo de electrones en el conductor externo indica que la hemipila del electrodo de Cu los atrae más fuertemente. El zinc de la barra se disuelve; libera iones Zn^{2+} en la solución de la cubeta. En cambio, sobre el electrodo de cobre se deposita más cobre metálico. La solución de iones zinc en el recipiente de la izquierda se hace más concentrada, mientras la de iones cúpricos en la otra cubeta se torna más diluida.

El sistema permite determinar, en unidades de fuerza electromotriz, la diferencia entre la tendencia a ganar electrones (potencial de reducción) de dos cuplas redox. Cuando la concentración de iones en las cubetas es de 1 mol por litro (solución 1 molar) y la temperatura es de 25°C (condiciones estándar), la diferencia de potencial para la pila Zn-Cu es de 1,10 V (voltios).

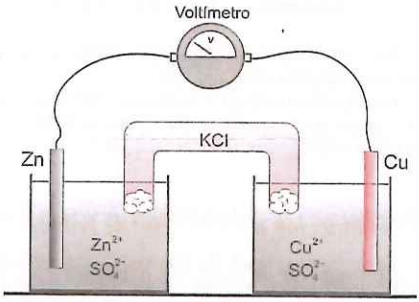


Fig. 9-2. Pila electroquímica.

Las mediciones de potencial de un par redox se realizan por comparación con el de un sistema de referencia al cual se le asigna valor 0, en un dispositivo similar al de la pila electroquímica. Se reemplaza una de las hemipilas por el denominado electrodo normal de hidrógeno, constituido por un trozo de platino saturado en su superficie con gas hidrógeno a la presión de 1 atmósfera, sumergido en una solución con iones H^+ a una concentración de 1 mol por litro (1 M, pH = 0). El par o cupla redox en este caso es $H^+/\frac{1}{2}\ H_2$, cuyo potencial se considera arbitrariamente 0.

El potencial se mide conectando el sistema en estudio con la hemipila de hidrógeno (si se mantienen las condiciones de concentración 1 M y temperatura de 25°C, se habla de potencial de reducción estándar, E_0).

Si la hemipila Zn^{2+}/Zn se conecta con el electrodo normal de hidrógeno, se comprueba una diferencia de potencial de 0,76 V; los electrones fluyen desde el electrodo de Zn al de hidrógeno.

La medición de la diferencia de voltaje entre la hemipila Cu^{2+}/Cu y la de hidrógeno da un valor de 0,34 V, pero en este caso los electrones fluyen desde el electrodo de H al de Cu.

Por convención, se asigna signo positivo (+) al par redox con mayor tendencia a sufrir reducción que el de hidrógeno, y signo negativo (–) al de tendencia menor que el par $H^+/\frac{1}{2}H_2$.

Como los potenciales de reducción se determinan en relación con el mismo sistema de referencia, si se conocen los potenciales de dos pares redox es posible predecir que, en condiciones estándar, el sistema con potencial más elevado tenderá a ganar electrones y sufrir reducción, mientras el otro se oxidará. Los electrones van siempre desde el par redox de menor a aquel de mayor potencial de reducción.

El Zn de la hemipila Zn^{2+}/Zn es capaz de reducir al ion H^+; esto indica que el potencial de reducción del par $H^+/\frac{1}{2}\ H_2$ es mayor que el del par Zn^{2+}/Zn, razón por la cual el potencial de éste se escribe con signo negativo.

$$Zn^{2+} + 2\ e^- \rightarrow Zn \qquad \Delta E_o = -0{,}76 \text{ voltios}$$

Para la hemipila Cu^{2+}/Cu, el potencial es mayor que el del par $H^+/\frac{1}{2}\ H_2$, por lo tanto, se le asigna signo positivo.

$$Cu^{2+} + 2\ e^- \rightarrow Cu \qquad \Delta E_o = +0{,}34 \text{ voltios}$$

Las diferencias de potencial de reducción entre dos pares redox crean diferencias de potencial electromotriz, a favor del cual se produce flujo de electrones. Este flujo determina liberación de

energía utilizable. El ΔG será tanto más negativo cuanto más grande sea la diferencia entre los potenciales de reducción de las sustancias que reaccionan. El cambio de energía libre estándar ($\Delta G°$) puede ser calculado, pues ΔE_o y $\Delta G°$ están relacionados según la ecuación:

$$\Delta G° = -n \cdot F \cdot \Delta E_o$$

n es el número de electrones transferidos, F es una constante (equivalente calórico del Faraday, 23,062 kcal o 96,49 kJ $\cdot V^{-1} \cdot mol^{-1}$), ΔE_o se expresa en voltios.

En el ejemplo de las cuplas Zn^{2+}/Zn y Cu^{2+}/Cu, el valor de ΔE_o es:

$$+0{,}34 - (-0{,}76) = 1{,}10 \text{ voltios}$$

el $\Delta G°$ de la reacción

$$Cu^{2+} + Zn \longrightarrow Zn^{2+} + Cu$$

será:

$$\Delta G° = -2 \cdot 96{,}49 \cdot 1{,}10 = -50{,}736 \text{ kcal/mol} \quad (-212{,}28 \text{ kJ/mol})$$

En la tabla 9-1 se dan valores del potencial de reducción estándar (a 25°C y concentración 1 M) para cuplas redox de interés biológico. Los valores son ajustados a pH 7,0 (E_o'). A este pH, que es más próximo al fisiológico, el potencial de reducción para el par $H^+/½\ H_2$ no es cero sino –0,42 V (la concentración de H^+ no es 1 M sino 10^{-7} M).

Los valores de la tabla 9-1 corresponden a sistemas en los cuales las concentraciones de las formas reducida y oxidada son iguales entre sí (1 M). Si la concentración de la forma reducida es mayor que la oxidada, el potencial de reducción se hace más negativo y viceversa.

OXIDACIONES BIOLÓGICAS

Gran parte de los sustratos oxidados en el organismo sufren deshidrogenación. Los hidrógenos sustraídos al sustrato se unen finalmente a oxígeno molecular para formar agua:

$$½\ O_2 + 2\ H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2O$$

El potencial de reducción (E_o') de esta semirreacción es +0,82 voltios.

Las reacciones de deshidrogenación son catalizadas por enzimas (deshidrogenasas) específicas para cada sustrato; los hidrógenos son captados por la coenzima, un nucleótido de nicotinamida (NAD o NADP) o una flavina (FAD).

Para el NAD, la semirreacción puede representarse:

$$NAD^+ + 2\ H^+ + 2\ e^- \rightleftharpoons NADH + H^+$$
$$E_o' = -0{,}32 \text{ V}$$

La diferencia de potencial entre las cuplas redox $½O_2/H_2O$ y $NAD^+/NADH + H^+$ es +0,82 – (–0,32) = 1,14 voltios. Por lo tanto, el $\Delta G°'$ de la reacción de oxidorreducción entre ambos pares será:

Tabla 9-1. Potenciales de reducción estándar (E_o') de algunos pares redox de importancia biológica.

Semirreacción	E'_o (en voltios)
α-cetoglutarato + $2H^+$ + 2 e^- $\rightleftharpoons$ Succinato + CO_2	–0,67
Acetato + $2H^+$ + 2 e^- $\rightleftharpoons$ Acetaldehído	–0,60
H^+ + e^- $\rightleftharpoons$ ½ H_2	–0,42
NAD^+ + $2H^+$ + 2 e^- $\rightleftharpoons$ NADH + H^+	–0,32
$NADP^+$ + $2H^+$ + 2 e^- $\rightleftharpoons$ NADPH + H^+	–0,32
Piruvato + $2H^+$ + 2 e^- $\rightleftharpoons$ Lactato	–0,19
FAD + $2H^+$ + 2 e^- $\rightleftharpoons$ $FADH_2$	–0,12
Fumarato + $2H^+$ + 2 e^- $\rightleftharpoons$ Succinato	+0,03
Coenzima Q + $2H^+$ + 2 e^- $\rightleftharpoons$ Citocromo b (Fe^{3+})	+0,04
Citocromo b (Fe^{3+}) + e^- $\rightleftharpoons$ Coenzima QH_2	+0,07
Citocromo c_1 (Fe^{3+}) + e^- $\rightleftharpoons$ Citocromo c_1 (Fe^{2+})	+0,22
Citocromo c (Fe^{3+}) + e^- $\rightleftharpoons$ Citocromo c (Fe^{2+})	+0,25
Citocromo a (Fe^{3+}) + e^- $\rightleftharpoons$ Citocromo a (Fe^{2+})	+0,29
Citocromo a_3 (Fe^{3+}) + e^- $\rightleftharpoons$ Citocromo a_3 (Fe^{2+})	+0,55
½ O_2 + $2H^+$ + 2 e^- $\rightleftharpoons$ H_2O	+0,82

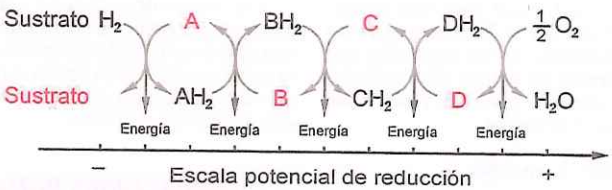


Fig. 9-3. Representación esquemática de un proceso de oxidación en etapas. En rojo, sustratos oxidados; en negro, sustratos reducidos.

$\Delta G^{\circ\prime} = -n \cdot F \cdot \Delta E_o = -2 \cdot 96{,}49 \cdot 1{,}14 = -52{,}6$ kcal/mol (−220 kJ/mol)

Se trata de una reacción fuertemente exergónica; si ocurriese en una etapa, se produciría liberación brusca de energía (calor) no aprovechable por la célula. En los procesos biológicos, en general, los hidrógenos sustraídos al sustrato no son directamente oxidados por el oxígeno sino transferidos, en etapas sucesivas, a distintas sustancias aceptoras de potencial de reducción creciente. De este modo, la energía se libera en forma fraccionada y puede ser captada por la célula.

El proceso es esquematizado en la figura 9-3. Un sustrato reducido (SustratoH_2) es oxidado por el compuesto A, de potencial de reducción superior. El sustrato cede sus hidrógenos a A, que se reduce (AH_2). La liberación de energía en esta reacción es proporcional a la diferencia entre los potenciales de reducción del sustrato y A. En una segunda etapa, AH_2 es oxidado por el compuesto B, de mayor potencial y, de nuevo, ocurre una moderada liberación de energía. La situación se repite entre BH_2 y el compuesto siguiente (C) y luego entre CH_2 y el compuesto D, cuyo potencial de reducción está más próximo al del agente oxidante terminal, el oxígeno molecular. El resultado final es el mismo de la oxidación directa, el oxígeno capta dos hidrógenos para formar agua, pero la liberación de energía ha sido subdividida en fracciones utilizables para realizar trabajo.

Mitocondrias

Las mitocondrias son las organelas en las cuales tiene lugar la transferencia ordenada de electrones y la captación de la energía generada por el flujo de electrones. El tamaño, forma y número de mitocondrias varían de un tejido a otro, pero su estructura básica es similar en todos. Poseen una *membrana externa*, en contacto con el citosol, permeable a iones y moléculas de masa menor que 6 kDa. Esta permeabilidad se debe a la existencia de poros o canales formados por una proteína transmembrana llamada *porina*. Dentro de la membrana externa, separado de ella por un *espacio intermembrana*, se encuentra un segundo saco cerrado, constituido por la *membrana interna*, que contiene un espacio central o *matriz mitocondrial* (fig. 9-4). La membrana interna posee una permeabilidad muy selectiva; sólo puede ser atravesada por agua, O_2, CO_2, NH_3 y algunos compuestos que cuentan con sistemas de transporte. Presenta invaginaciones llamadas *crestas*, más abundantes en mitocondrias de células con intensa actividad respiratoria. En la membrana interna, la cara que mira hacia la matriz presenta gran número de formaciones esferoidales (*partículas submitocondriales*) implantadas en un corto tallo.

La composición de la membrana interna tiene características distintivas; es extraordinariamente rica en proteínas, que constituyen casi el

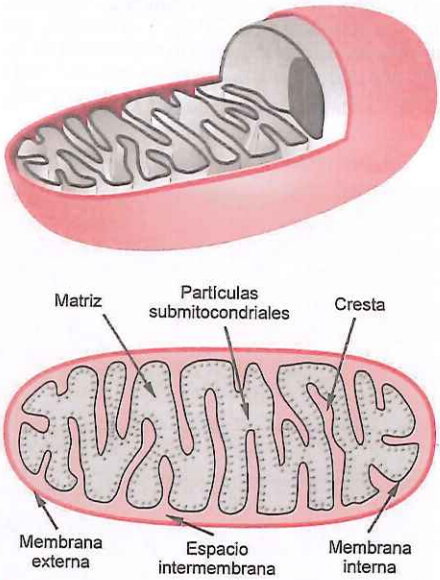


Fig. 9-4. Arriba: Diagrama tridimensional de una mitocondria seccionada. Abajo: Corte transversal.

80% de sus componentes. Contiene *cardiolipina*, inexistente en otras membranas; este fosfolípido participa en diversas actividades de la organela, además de la producción de ATP.

En la masa gelatinosa de la matriz hay gran cantidad de enzimas integrantes de las vías centrales del metabolismo oxidativo (ciclo de Krebs o del ácido cítrico, vía de oxidación de ácidos grasos, etc.). La membrana interna contiene los integrantes de la cadena respiratoria, las estructuras y enzimas responsables de la captación de energía y síntesis de ATP y distintos sistemas de transporte.

Además de su papel fundamental en el metabolismo energético, las mitocondrias participan en otro proceso de gran importancia: la apoptosis o muerte celular programada (ver pág. 703).

CADENA RESPIRATORIA

Según se ha indicado, en las oxidaciones biológicas los hidrógenos sustraídos al sustrato son transferidos en forma gradual a través de aceptores que experimentan cambios reversibles en su estado redox. En la membrana interna de las mitocondrias estos aceptores están dispuestos ordenadamente según un gradiente de potencial de reducción creciente y asociados íntimamente a las enzimas que catalizan las transferencias. El conjunto recibe el nombre de *cadena respiratoria* o *cadena de transporte electrónico*.

Dos hidrógenos cedidos en una reacción redox representan la suma de dos protones (H^+) y dos electrones (e^-). Hidrógenos y electrones frecuentemente son denominados *equivalentes de reducción*.

La cadena respiratoria comprende una serie de etapas. Durante todo el recorrido, los electrones fluyen naturalmente en el sentido que les fija el desnivel en el potencial de reducción de los aceptores. En un sistema como el esquematizado en la figura 9-3, se deslizan desde A a B, a C, a D, y a oxígeno secuencialmente, impulsados por el potencial creciente.

Todos los integrantes de la cadena de transporte de electrones se encuentran en la membrana interna de la mitocondria, constituyendo un sistema multienzimático altamente ordenado. Su inclusión en la membrana asegura la disposición espacial adecuada para un óptimo funcionamiento.

Al analizar el proceso de oxidación de un sustrato y la transferencia de electrones, uno podría preguntarse por qué el sustrato no entrega sus hidrógenos directamente al oxígeno o a otros aceptores con mayor potencial de reducción que el NAD por ej., ya que esas reacciones son termodinámicamente más favorables. Esto se explica si se recuerda que, en las condiciones existentes en la célula, toda reacción química transcurre gracias a la existencia de catalizadores. Sólo la presencia de enzimas específicas asegura el cumplimiento de las etapas y la liberación de energía en forma gradual y controlable. Los hidrógenos no pasan directamente de un sustrato dado al oxígeno o a cualquier otro aceptor si no existen enzimas que catalicen la transferencia.

Transferencia de equivalentes de reducción

Nicotinamida adenina dinucleótido. Numerosos sustratos oxidables de distinta naturaleza (piruvato, α-cetoglutarato, malato, isocitrato, glutamato, 3-OH-acilcoenzima A, etc.) son deshidrogenados en la matriz mitocondrial en reacciones catalizadas por enzimas específicas (deshidrogenasas) cuya coenzima es un nucleótido de nicotinamida.

La *nicotinamida*, derivada del núcleo piridina, está relacionada con el ácido nicotínico, vitamina perteneciente al grupo o complejo B (pág. 589). En las células existen dos coenzimas de este tipo, *nicotinamida adenina dinucleótido* (NAD) y *nicotinamida adenina dinucleótido fosfato* (NADP) (fig. 9-5).

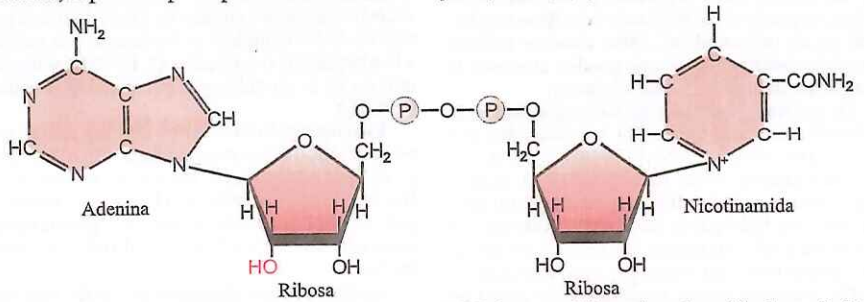


Fig. 9-5. Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). En el NADP el grupo –OH en rojo está esterificado por fosfato.

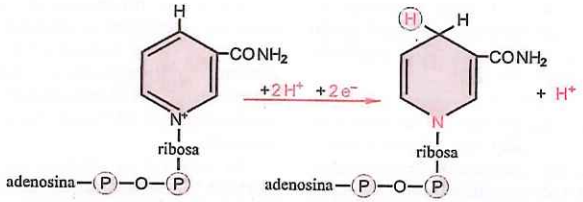


Fig. 9-6. NAD como aceptor de hidrógeno y electrones.

En su estado reducido estas coenzimas se encuentran unidas a un hidrógeno y a un electrón; de los dos hidrógenos cedidos por el sustrato queda un protón en el medio. Las reacciones se representan:

$$AH_2 + NAD^+ \rightarrow A + NADH + H^+$$
$$AH_2 + NADP^+ \rightarrow A + NADPH + H^+$$

Sustrato reducido — Sustrato oxidado

La porción nicotinamida de la molécula actúa como aceptora de hidrógeno y electrones (fig. 9-6). Uno de los hidrógenos se une al carbono 4 del anillo piridina, mientras un electrón del otro hidrógeno se fija al nitrógeno del ciclo. Queda un protón libre en el medio.

Las deshidrogenasas ligadas a NAD o NADP no forman parte de la cadena respiratoria; se encuentran en la matriz mitocondrial. La coenzima NAD reducida cede equivalentes de reducción al primer aceptor de la cadena de transporte electrónico y de este modo vuelve a quedar oxidada.

Existen también deshidrogenasas unidas a NAD y NADP en el citosol, pero como la membrana interna de las mitocondrias no es permeable a los nucleótidos de adenina, NADH y NADPH formados en el citosol no pueden ceder directamente sus hidrógenos a la cadena. Su oxidación se realiza mediante sistemas "lanzadera" o conmutadores, con capacidad para transferir hidrógenos desde el citosol hacia la cadena respiratoria en las mitocondrias. Estos sistemas utilizan aceptores intermediarios que pueden atravesar la membrana interna (ver más adelante).

En general, el destino de los equivalentes de reducción no es el mismo si son captados por NAD o por NADP. El NAD reducido en la matriz mitocondrial cede hidrógenos a la cadena respiratoria con la finalidad de producir energía, mientras los hidrógenos de NADP reducido son utilizados preferentemente en síntesis de diversos compuestos. Sin embargo, eventualmente el NADP reducido puede transferir H al NAD en reacción catalizada por *transhidrogenasa*:

$$NADPH + NAD^+ \rightleftharpoons NADP^+ + NADH$$

De esta manera, hidrógenos originalmente captados por NADP podrían llegar a la cadena respiratoria.

Componentes de la cadena respiratoria

La cadena respiratoria es un conjunto de aceptores y transportadores de equivalentes de reducción, incluidos en la membrana interna de las mitocondrias. Muchos de sus componentes se agrupan en complejos multimoleculares que atraviesan todo el espesor de la bicapa lipídica. Existen cuatro de estos complejos y, además, hay otros dos integrantes de la cadena que se encuentran libres (coenzima Q y citocromo *c*), representados esquemáticamente en la figura 9-11.

El NAD reducido es oxidado por el primer complejo de la cadena respiratoria, llamado *NADH-ubiquinona reductasa*. Es el complejo de mayor tamaño (>900 kDa), formado por unas 45 cadenas polipeptídicas; contiene una molécula de flavina mononucleótido (FMN) como grupo prostético y 16 a 24 átomos de hierro en 7 a 9 centros ferro-sulfurados (ver más adelante).

Los electrones transferidos desde NADH al complejo NADH-ubiquinona reductasa son captados inicialmente por flavina mononucleótido (FMN), el cual se reduce a $FMNH_2$; luego pasan sucesivamente por átomos de Fe de distintos centros Fe-S del complejo y finalmente son cedidos a la ubiquinona o coenzima Q. El FMN y los átomos de Fe se reoxidan y la coenzima Q se reduce ($CoQH_2$).

Flavoproteínas. Tienen flavina como grupo prostético firmemente unido. En el complejo NADH-ubiquinona reductasa se encuentra flavina mononucleótido (FMN), constituido por el núcleo isoaloxazina, un pentaalcohol derivado de ribosa llamado ribitol y un resto fosfato.

Flavina adenina dinucleótido (FAD) está integrado por isoaloxazina, ribitol y fosfato, es decir, los

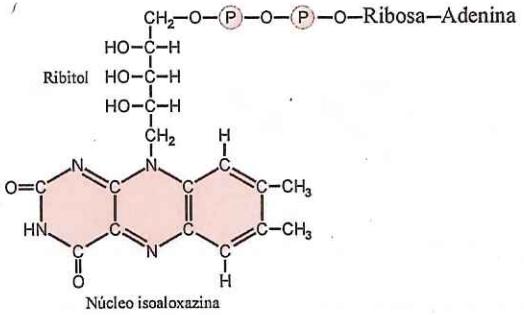


Fig. 9-7. Flavina adenina dinucleótido (FAD).

componentes de FMN, más otro nucleótido, adenosina monofosfato (AMP), cuyo fosfato se une al del FMN por un enlace pirofosfato (fig. 9-7).

Sustratos existentes en la matriz mitocondrial, como succinato, acil-coenzima A, glicerol-3-fosfato, etc., son oxidados por deshidrogenasas que utilizan flavina adenina dinucleótido (FAD) como coenzima. En la reacción, el FAD se reduce a $FADH_2$.

El núcleo isoaloxazina y el ribitol, que forman parte de las moléculas de FMN y FAD, son componentes de la riboflavina, vitamina del complejo B. Tanto en el FMN como en el FAD, el núcleo isoaloxazina es la porción de la molécula que acepta los dos hidrógenos transferidos (fig. 9-8).

Una flavoproteína ligada a FAD que cataliza la oxidación de succinato (succinato deshidrogenasa) integra el complejo llamado *succinato-ubiquinona reductasa*, constituido por cuatro subunidades polipeptídicas, una molécula de FAD como grupo prostético, ocho átomos de Fe y ocho de S distribuidos en tres centros ferrosulfurados. Los electrones fluyen desde el succinato al FAD, que se convierte en $FADH_2$, y a los átomos de Fe^{3+} de los centros sulfoférricos, para ser transferidos finalmente a la coenzima Q. El $FADH_2$ se reoxida a FAD. El cambio de energía libre durante el pasaje de electrones a través del complejo succinato-ubiquinona reductasa es menor que el del complejo NADH-ubiquinona reductasa.

Centros Fe-S. Los centros ferrosulfurados o sulfoférricos poseen hierro no hemínico, es decir no asociado a hemo, sino a azufre. Los más simples poseen sólo un átomo de Fe coordinado con los sulfhidrilos de cuatro restos cisteína en la proteína. En algunos centros hay dos átomos de Fe unidos a dos de S inorgánico (Fe_2S_2) y en otros existen cuatro átomos de Fe y cuatro de S inorgánico (Fe_4S_4). Estos átomos de S se separan fácilmente como ácido sulfhídrico por tratamiento con ácidos fuertes. En los centros Fe_2S_2 y Fe_4S_4, el Fe también se une al S de cadenas laterales de cisteína de la proteína (fig. 9-9). Cada átomo de hierro capta un electrón y pasa del estado férrico al ferroso en forma reversible ($Fe^{3+} \rightleftharpoons Fe^{2+}$). Estas proteínas sulfoférricas se encuentran en varios complejos de la cadena respiratoria. El potencial estándar de reducción de la cupla redox Fe^{3+}/Fe^{2+} en las distintas proteínas ferrosulfuradas varía entre –0,24V y +0,30V.

Coenzima Q. Recibe también el nombre de *ubiquinona* por su naturaleza química y su ubicuidad en los sistemas biológicos. Es una benzoquinona con una larga cadena formada por diez unidades isopreno (en total 50 carbonos). Las estructuras de sus formas oxidada y reducida se muestran en la figura 9-10.

Este aceptor es el único de la cadena respiratoria no unido a proteínas. Su cadena isoprenoi-

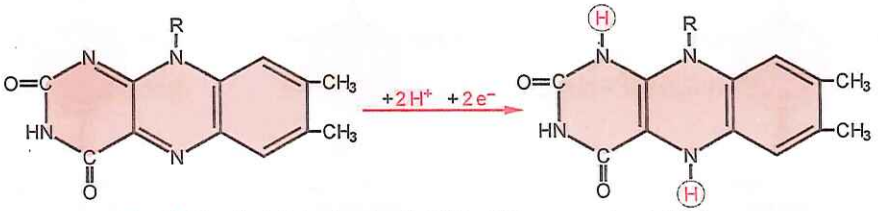


Fig. 9-8. Función de la isoaloxazina de FMN y FAD como aceptora de hidrógenos.

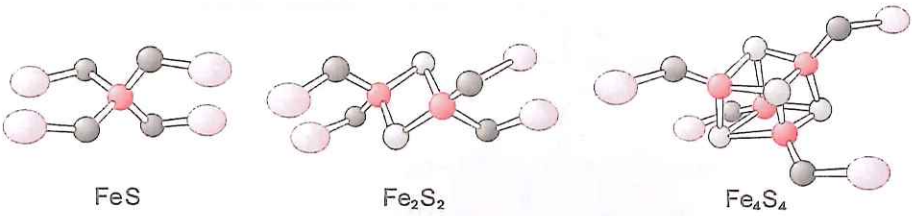


Fig. 9-9. Centros hierro-azufre. Fe: rojo; S inorgánico: gris; S de cisteína: negro; restos cisteína: óvalos rosados.

de, hidrófoba, le permite alojarse en la zona apolar de la bicapa lipídica de la membrana interna, dentro de la cual se desplaza con cierta libertad. Actúa como un portador móvil de electrones.

En las etapas hasta aquí descriptas, se ha producido transferencia de un par de hidrógenos desde el sustrato hasta la ubiquinona. Para algunos sustratos, los equivalentes de reducción pasan primero a NAD y luego a FMN y centros Fe-S del complejo NADH-ubiquinona reductasa; para otros, los hidrógenos se transfieren a flavoproteínas con FAD, como en el complejo succinato-ubiquinona reductasa. En ambos casos son aceptados por la ubiquinona. Es decir, la coenzima Q recibe hidrógenos de diversa procedencia (fig. 9-11). La disminución de energía libre (ΔG) del pasaje de equivalentes de reducción desde el complejo succinato-ubiquinona reductasa es menor que desde NADH-ubiquinona reductasa.

En la próxima etapa, la ubiquinona reducida ($CoQH_2$) transfiere dos electrones a los aceptores siguientes, pertenecientes a la familia de los citocromos.

Citocromos. Son hemoproteínas con capacidad para aceptar electrones. El átomo de hierro del hemo capta un electrón, pasando del estado oxidado (Fe^{3+}) al reducido (Fe^{2+}). Se han identificado varios tipos de citocromos en la cadena respiratoria, dos citocromos *a* (*a* y a_3), dos *b* (b_{566} y b_{562}) y dos *c* (*c* y c_1). Se distinguen por su potencial de reducción y espectro de absorción de la luz. En el caso de los citocromos *b*, el subíndice que los identifica corresponde a la longitud de onda a la cual tienen su máxima absorción. Su ordenamiento según potencial de reducción creciente es b_{566}–b_{562}–c_1–*c*–*a*–a_3.

Los citocromos *b* y *c* contienen un grupo prostético hemo idéntico al de hemoglobina y mioglobina (Fe complejado con protoporfirina IX). Los citocromos *a* poseen hemo A, con dos cadenas laterales distintas de las del hemo. Las moléculas de citocromos *a* y a_3 son iguales, pero tienen diferente potencial de reducción porque están localizadas en ambientes distintos en el complejo del cual forman parte. Los citocromos *a* están asociados con un ion Cu, ubicado cerca del Fe del hemo A. Los metales complejados sufren oxidorreducción, reciclando entre los estados Fe^{3+}/Fe^{2+} y Cu^{2+}/Cu^{+}.

Los citocromos *b* y c_1 integran un complejo llamado *ubiquinona-citocromo c reductasa*, formado por 11 subunidades polipeptídicas diferentes, incluyendo los dos citocromos *b* y el c_1. También se encuentra en este complejo una proteína sulfoférrica (2Fe-2S).

Desde el complejo ubiquinona-citocromo *c* reductasa, los electrones pasan al citocromo *c*.

El *citocromo c* es una hemoproteína de 13 kDa, compuesta por 104 restos aminoacídicos y un grupo prostético hemo igual al de hemoglobina y mioglobina. La secuencia de aminoácidos del citocromo *c* ha sido conservada con pocas modificaciones a lo largo de la evolución. Es una

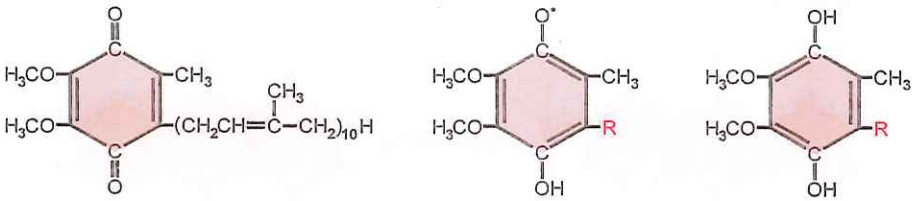


Fig. 9-10. Coenzima Q o ubiquinona.

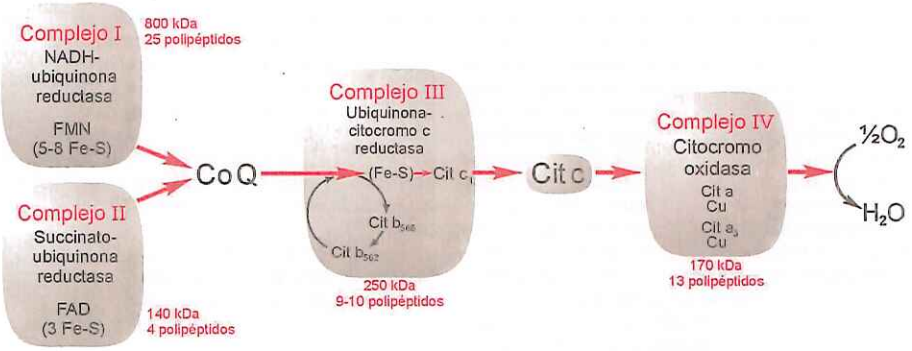


Fig. 9-11. Ordenamiento de los componentes de la cadena respiratoria.

proteína periférica, ubicada del lado exterior de la membrana mitocondrial interna, asociada por atracciones electrostáticas a las cabezas polares de los fosfolípidos. Puede ser separado fácilmente de la membrana mediante tratamiento con soluciones salinas. Su molécula posee, rodeando el nicho en el cual se encuentra el hemo, varias cadenas laterales de restos lisina, cuyas cargas positivas son importantes para el reconocimiento y unión a los complejos situados inmediatamente antes y después en la secuencia de aceptores de electrones de la cadena respiratoria. El citocromo *c* es un transportador móvil que recibe electrones de la ubiquinona-citocromo *c* reductasa y los transfiere al complejo citocromo oxidasa, responsable de la última etapa del sistema.

La *citocromo oxidasa* está formada por 11 a 13 subunidades polipeptídicas. Este complejo, como los anteriores, atraviesa todo el espesor de la membrana. Contiene un citocromo *a*, uno a_3 y dos iones cobre, que forman dos centros hemo-Cu. La citocromo oxidasa es el único componente del sistema de transporte electrónico con capacidad para reaccionar directamente con oxígeno. Una molécula de oxígeno (O_2) capta cuatro electrones y se une a cuatro protones para formar dos moléculas de agua. La ecuación total es:

$$O_2 + 4\ e^- + 4\ H^+ \rightarrow 2\ H_2O$$

En esta reacción convergen simultáneamente cuatro electrones, lo cual plantea un interrogante de difícil respuesta, ya que el citocromo a_3, último aceptor de la cadena, sólo transporta un electrón por vez y los electrones no pueden existir libres en el medio.

Se ha propuesto, para explicar esta reacción, que la reducción completa del oxígeno se realiza-ría en un ciclo de varias etapas, llamado ciclo Q, que se considerará más adelante.

Los complejos de la cadena respiratoria

A excepción de la ubiquinona, que se encuentra libre en el interior de la doble capa lipídica, y del citocromo *c*, cuya molécula está adosada a la cara externa de la membrana interna, los restantes componentes de la cadena respiratoria se agrupan en cuatro complejos multimoleculares que ocupan todo el espesor de la membrana. Estos complejos son designados con números romanos.

Complejo I es la NADH-ubiquinona reductasa. Por intermedio de NAD, recibe hidrógenos de sustratos oxidados por deshidrogenasas ligadas a esa coenzima. Contiene FMN y varios centros Fe-S. Entrega los hidrógenos a ubiquinona.

Complejo II corresponde a la succinato-ubiquinona reductasa. Posee un grupo prostético FAD y tres centros Fe-S. Transfiere equivalentes de reducción desde succinato a coenzima Q.

Complejo III es la ubiquinona-citocromo *c* reductasa. Contiene citocromos b_{566}, b_{562} y c_1 y un centro Fe-S. Transfiere electrones desde ubiquinona a citocromo *c*.

Complejo IV es la citocromo oxidasa, en la cual están incluidos los citocromos *a* y a_3 y dos iones Cu. Cataliza la reducción de O_2 a H_2O.

La figura 9-11 esquematiza la constitución y ordenamiento de los complejos. Este ordenamiento de los componentes de la cadena respiratoria tiene apoyo experimental. Una de las evidencias es el valor de los potenciales de reducción de los distintos pares redox que la integran. Los valores de E_o' (tabla 9-1) son gradualmente crecientes en el sentido del flujo de electrones.

Debe recordarse que los valores de E_o' son determinados en equilibrio, con concentraciones iguales (1 M) de las formas oxidada y reducida en cada par y en condiciones que no reproducen situaciones fisiológicas habituales (por ej., para la CoQ deben realizarse en soluciones etanólicas, dada la insolubilidad del compuesto en agua); por lo tanto, en un momento determinado, puede haber diferencias importantes entre el valor E_o' y el correspondiente al par redox en la célula. Sin embargo, los valores estándar sirven como criterio aproximado para predecir el sentido más probable del desplazamiento de electrones.

Por otra parte, la distribución de los componentes en los cuatro complejos es perfectamente compatible con el ordenamiento propuesto.

Inhibidores del transporte de electrones

Un recurso útil para establecer la secuencia de la cadena ha sido el uso de inhibidores que actúan en sitios específicos. El estado redox de los distintos componentes puede determinarse por espectrofotometría directamente en suspensiones de mitocondrias. Cuando se agrega a la preparación un inhibidor que bloquea la transferencia de electrones en un punto determinado, los componentes de la cadena que participan en las instancias previas al sitio afectado aparecerán reducidos y los de etapas posteriores estarán oxidados, pues no reciben electrones. Los estudios con distintos agentes bloqueantes del transporte de electrones apoyan el ordenamiento propuesto. Como ejemplo se mencionarán algunos de los inhibidores más utilizados.

Actúan a nivel del complejo I (NADH-ubiquinona reductasa): *rotenona*, producto vegetal, poderoso veneno de peces, *amital* y otros barbitúricos, y anestésicos como *halotano*. Estas sustancias impiden la llegada a la CoQ de hidrógenos procedentes de sustratos oxidados por deshidrogenasas ligadas a NAD. No afectan, en cambio, la oxidación de succinato y otros sustratos que ceden hidrógenos a flavoproteínas con FAD, probando así que éstos siguen otra vía. El antibiótico *antimicina A* inhibe el transporte de electrones en el complejo III. Cianuros (CN^-), monóxido de carbono (CO) y azidas (N^{3-}) inhiben específicamente la citocromo-oxidasa o complejo IV y bloquean la etapa final de reducción del oxígeno (fig. 9-12).

El uso de inhibidores no sólo ha ayudado a deducir la secuencia de la cadena respiratoria, sino que ha permitido conocer mejor el mecanismo de acción de algunos fármacos y venenos.

FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

Hasta aquí se ha analizado el curso de las oxidaciones en las mitocondrias y el flujo de electrones en la cadena respiratoria a favor del gradiente de potencial de reducción. Se trata de un proceso exergónico, que transcurre con disminución de energía libre ($-\Delta G$). Interesa ahora examinar cómo esta energía es convertida en potencial de transferencia de fosforilos para la síntesis de ATP. La unión de ADP con fosfato inorgánico (P_i):

$$ADP + P_i \rightarrow ATP + H_2O$$

es una reacción endergónica que ocurre cuando es acoplada a procesos que suministran la energía necesaria. La producción de ATP utilizando energía liberada durante el transporte de electrones en la cadena respiratoria es denominada *fosforilación oxidativa*.

El $\Delta G^{\circ\prime}$ de hidrólisis de la unión entre el tercero (γ) y el segundo (β) fosfato de ATP es –7,3 kcal/mol (–30,5 kJ/mol); por lo tanto, se requiere una cantidad igual o mayor de energía para sintetizar ATP a partir de ADP y P_i.

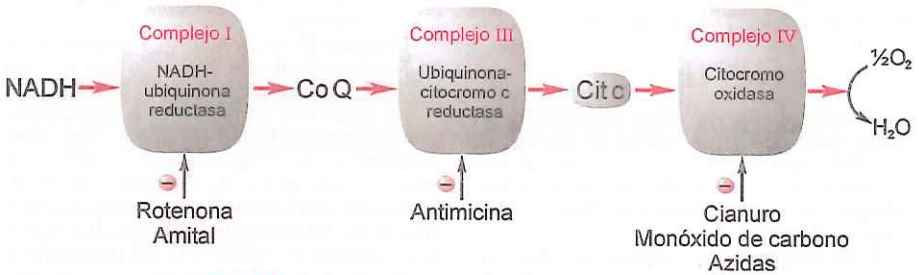


Fig. 9-12. Cadena respiratoria. Sitios de bloqueo por inhibidores.

Cuando un sustrato es oxidado en reacciones catalizadas por enzimas que utilizan NAD, éste transfiere los equivalentes de reducción al primer componente de la cadena por acción de la NADH deshidrogenasa; desde allí recorren todos los aceptores intermedios hasta producir finalmente una molécula de agua. Según el cálculo expuesto en secciones anteriores, este proceso transcurre con una disminución total de energía libre de –52,6 kcal o –220 kJ por mol, la cual se fracciona en una serie de etapas. Tres de esas etapas producen suficiente liberación de energía como para acoplar a cada una la formación de un enlace fosfato de alta energía: a) la transferencia de hidrógenos desde NADH a CoQ, es decir, a nivel de la NADH-ubiquinona reductasa o complejo I, b) la cesión de electrones en la ubiquinona-citocromo *c* reductasa o complejo III y *c*) la reacción de la citocromo-oxidasa o complejo IV.

En realidad, la síntesis de ATP no ocurre por acoplamiento directo con esas reacciones. Sin embargo, el concepto de la existencia de estos tres sitios ha sido útil en el estudio del funcionamiento de la cadena respiratoria.

Relación P:O. En experimentos de medición del consumo de oxígeno y fosfato inorgánico por mitocondrias en presencia de un sustrato oxidable, se pudo calcular el número de moléculas de ATP producidas. Utilizando malato, compuesto que cede dos hidrógenos a NAD en reacción catalizada por malato deshidrogenasa, se estimó una relación entre fosfatos y átomos de oxígeno consumidos (relación P:O) igual a tres. Esto indicaría que por cada par de hidrógenos o electrones transferidos a lo largo de la cadena respiratoria, se unen tres fosfatos a tres moléculas de ADP. Es decir, el flujo de un par de electrones permitiría la síntesis de tres moléculas de ATP. La misma relación P:O de 3 se obtenía con otros sustratos que ceden hidrógenos a NAD.

Cuando se utilizaba succinato, sustrato oxidado en reacción catalizada por succinato deshidrogenasa ligada a FAD, la relación P:O era igual a 2. La producción de ATP sería de dos moléculas por cada par de electrones transferidos. El valor 2 para la relación P:O se daba también con otros sustratos oxidados en reacciones en las cuales la coenzima es FAD. Estas observaciones indicaban que uno de los sitios de producción de ATP estaba asociado a la NADH-ubiquinona reductasa, pues cuando los equivalentes de reducción ingresaban por otra vía (FAD→CoQ), el rendimiento era menor en un ATP.

Si bien durante mucho tiempo se han aceptado los valores mencionados, nuevas determinaciones del rendimiento en ATP de la fosforilación oxidativa no dan números enteros. Actualmente se acepta que por cada par electrónico transferido desde NADH a O_2 se producen alrededor de 2,5 moléculas de ATP. Cuando los electrones proceden de sustratos que los ceden a FAD (ej.: succinato, glicerol-3-fosfato) se generan aproximadamente 1,5 moléculas de ATP. En la sección siguiente se volverá sobre este tema.

Mecanismo de la fosforilación oxidativa

Un problema muy difícil de resolver es el del mecanismo por el cual la energía producida por la transferencia de electrones es aplicada a la síntesis de ATP. El primer paso importante fue el aislamiento, en la década del 60, de las estructuras en las cuales se forma ATP a partir de ADP y Pi.

ATP sintasa. Se calcula que un humano adulto consume alrededor de 40 kg de ATP en un día de actividad normal. Esta enorme cantidad es regenerada por el propio organismo. La mayor parte del ATP es sintetizada por la actividad de una enzima localizada en la membrana mitocondrial interna, la *ATP sintasa*, constituida por la asociación de dos complejos proteicos llamados F_1 y F_0.

F_1 integra las partículas submitocondriales, formaciones esferoidales unidas por un tallo a la faz de la membrana que mira a la matriz. Está compuesto por al menos nueve subunidades, 3 α, 3 β, 1 γ, 1 δ y 1 ε, cuya masa total es de ~380 kDa. Los polipéptidos α y β, apareados en dímeros $\alpha\beta$, se disponen como los gajos de una naranja, formando la "cabeza" de la partícula (fig. 9-13). Cada una de las subunidades β contiene un sitio catalítico. El polipéptido γ forma el tallo implantado por su base en el centro del complejo F_0, mientras el otro extremo se introduce, como un eje, en el hexámero $\alpha_3\beta_3$. La subunidad ε está firmemente fijada a la base de γ y al complejo F_0. El polipéptido δ se adhiere a la parte superior de la partícula (fig. 9-13).

Cuando están separadas de la membrana, las partículas F_1 sólo pueden catalizar la hidrólisis de ATP, razón por la cual inicialmente se las consideró adenosina trifosfatasas (ATPasa).

El complejo F_0, inserto en la membrana, tiene una masa de ~250 kDa, está formado por una subunidad *a*, 2 *b* y 10 a 14 *c*. Los polipéptidos *c*, con dos segmentos transmembrana cada uno, se disponen en anillo o rueda, a cuyo centro se unen las subunidades γ y ε de F_1. Adyacente a este anillo se dispone la subunidad *a*, que tiene 8 segmentos transmembrana y delimita, con las subunidades *c*, canales que permiten el paso de protones de uno a otro lado de la membrana. Los dos polipéptidos *b*,

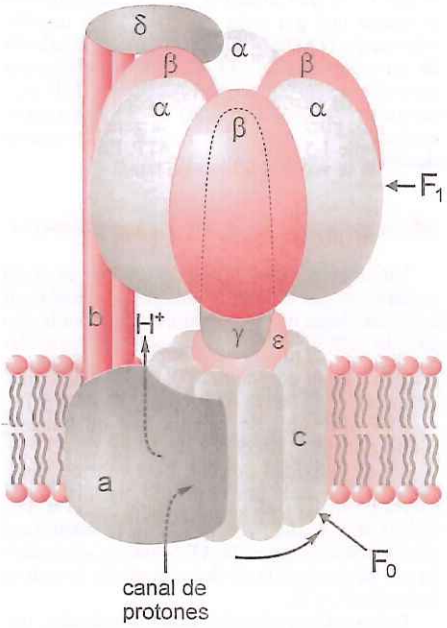


Fig. 9-13. Representación esquemática del complejo F_1-F_0 (ATP sintasa). La conformación y disposición de las subunidades es hipotética. La porción F_0 se encuentra incluida en la membrana interna de la mitocondria, a la cual atraviesa en todo su espesor; la porción F_1 sobresale hacia la matriz.

de estructura elongada, forman un vástago que une la pieza *a* con la subunidad δ. De esta manera, *a*, *b*, δ y el hexámero $\alpha_3\beta_3$ quedan todos fijados entre sí (fig. 9-13).

Hipótesis sobre el mecanismo de fosforilación oxidativa. Aún existen aspectos no resueltos del mecanismo de acoplamiento entre transferencia de electrones y síntesis de ATP, que algunos autores llaman *transducción* de energía. Esta abarca la transmisión de la energía producida durante el transporte electrónico al sitio de fosforilación y la utilización de la energía para la síntesis de ATP.

Se han postulado varias hipótesis, tres de las cuales han recibido mayor consideración.

1) En 1953, Slater propuso la hipótesis llamada *química*, que postula la formación de un intermediario químico de alta energía, muy inestable, entre la cadena respiratoria y la síntesis de ATP. Hasta ahora nadie ha podido demostrar la existencia de tal intermediario.

2) En 1964 Boyer presentó su hipótesis *conformacional*, la cual sostiene que el proceso de transducción de energía se realiza a través de proteínas capaces de sufrir cambios conformacionales responsables de transferir energía de los sistemas redox a la síntesis de ATP.

3) La hipótesis *quimio-osmótica*, enunciada en 1961 por Mitchell, cuenta con mayor sustento experimental y es la que se acepta actualmente. Sostiene que simultáneamente con el proceso de transporte electrónico, en la cadena respiratoria se produce transferencia de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio exterior a la membrana interna. De esta manera, el transporte de electrones se acopla con el bombeo unidireccional de protones, produce acumulación de hidrogeniones en el lado externo de la membrana y crea un gradiente electroquímico. La concentración de H^+ es mayor fuera de la membrana interna que en la matriz. Obviamente, el pH es menor en el espacio exterior. Hay también una diferencia de potencial eléctrico entre ambas caras de la membrana, con el lado externo relativamente más positivo que el interior. El resultado es la creación de un *potencial protón-motriz* que tiende a hacer regresar los protones hacia la matriz. Como la membrana interna es impermeable a los H^+, éstos sólo pueden volver a través del canal de la pieza F_0 de ATP sintasa. El retorno de protones al interior de la mitocondria a favor del gradiente es la fuerza impulsora de la síntesis de ATP.

En suma, la cadena respiratoria, dispuesta asimétricamente en la membrana interna, utiliza la energía liberada por la transferencia de electrones para bombear protones al exterior y crear un gradiente. Los protones tienen sólo la vía que les ofrece el complejo F_0F_1 para regresar a la matriz. La corriente de regreso provee la energía que permite generar ATP a partir de ADP y P_i (fig. 9-14).

Acoplamiento de transporte de electrones y translocación de protones

A la luz de la hipótesis quimio-osmótica, se analizará el transporte de electrones en la cadena respiratoria y su acoplamiento con la translocación de protones.

Los dos electrones cedidos por NADH en la cara interna del complejo NADH-ubiquinona reductasa (complejo I) se unen a FMN para dar la forma reducida $FMNH_2$. Esta los transfiere a los centros Fe-S y finalmente a ubiquinona. En esta etapa se produce pasaje de protones desde la matriz hacia el lado exterior de la membrana a través del complejo I. Aquí el número de protones trans-

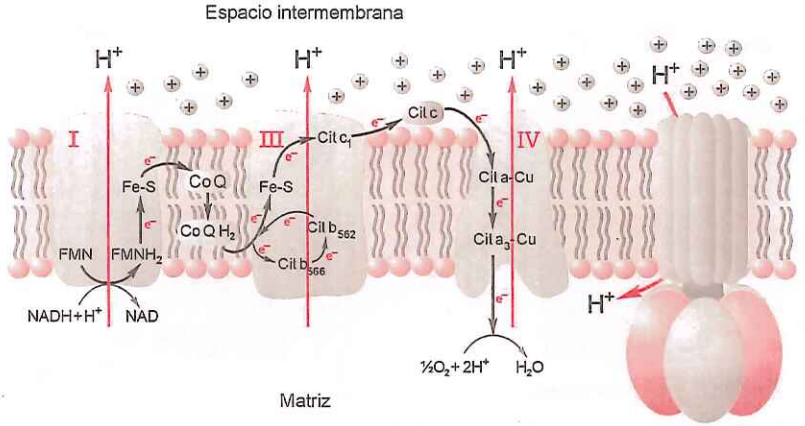


Fig. 9-14. Transferencia de protones según la hipótesis quimio-osmótica. Disposición en la membrana mitocondrial interna de componentes de la cadena de transporte electrónico. A la derecha se representa un complejo F_1F_0 de ATP sintasa.

locados varía entre 2 y 4 según los autores. El mecanismo íntimo del acoplamiento de la transferencia de electrones con la eyección de protones en el complejo I no es aún bien conocido.

El bombeo unidireccional de H^+ ocurre en los complejos I, III y IV, que atraviesan todo el espesor de la membrana. Por otra parte, según se había señalado, el flujo de electrones a través de cada uno de esos complejos es altamente exergónico. La energía generada puede ser acoplada al transporte de protones. El mecanismo de la translocación de protones ha sido mejor explicado para el complejo III, con el llamado ciclo Q.

Ciclo Q. La coenzima Q, transportador móvil de hidrógeno (H^+ y e^-), recibe dos electrones procedentes de NADH o $FADH_2$ a través de los complejos I o II respectivamente y además toma dos protones de la matriz para convertirse en $CoQH_2$. Esta ubiquinona reducida migra hacia un complejo III y, en un sitio de éste próximo a la cara externa de la membrana, cede un electrón a los centros Fe-S, que pasa a citocromo c_1 y finalmente, fuera del complejo, a citocromo c. La $CoQH_2$ que ha cedido un electrón, libera dos protones hacia el espacio intermembrana y se oxida totalmente (a CoQ) donando el electrón restante a los citocromos b (sucesivamente a b_{566} y b_{562}), que lo ceden a CoQ, la cual se convierte en semiquinona ($CoQ^{\cdot-}$) (fig. 9-10). Esto cierra la primera etapa del ciclo. Se inicia ahora una segunda fase, en la cual otra molécula de $CoQH_2$ repite los pasos descriptos para la primera: cesión de un electrón a citocromo c, otro a citocromo b y dos protones bombeados al exterior. Pero esta vez el electrón recibido por citocromo b_{562} es donado a la semiquinona formada anteriormente, que capta este segundo electrón y dos protones de la matriz para formar $CoQH_2$, lista para iniciar un nuevo ciclo (fig. 9-15). El resultado de cada ciclo es la oxidación de una molécula de $CoQH_2$, la expulsión de cuatro protones y la transferencia de dos electrones a sendas moléculas de citocromo c, en la superficie externa de la membrana.

Etapas finales: reducción de O_2. Los electrones son transportados por el citocromo c hacia el sitio aceptor del complejo IV (el citocromo c es un transportador móvil). El complejo de la citocromo oxidasa conduce los electrones hacia la superficie interna y allí los dona al oxígeno. El complejo IV es el tercer sitio de bombeo de protones. No hay acuerdo entre los autores acerca del número de protones eyectados en esta etapa; se proponen entre 2 y 4.

El proceso de reducción total de una molécula de oxígeno requiere la transferencia de cuatro electrones. Como el transporte a los citocromos se realiza de a uno por vez, existe el riesgo de liberar productos de reducción parcial de O_2, que son tóxicos (ver Cap. 10). Para reducir este riesgo, la molécula de oxígeno es fijada en el centro hemo-Cu del citocromo a_3, entre los átomos de Fe y Cu, y allí permanece hasta haber recibido cuatro electrones. Las etapas de este proceso han sido representadas en la figura 9-16.

1. Inicialmente los átomos de Fe y Cu del citocromo a_3 se encuentran oxidados (Fe^{3+} y Cu^{2+}). En la primera etapa ingresa un electrón, que es captado por el Cu^{2+} (se convierte en Cu^+).

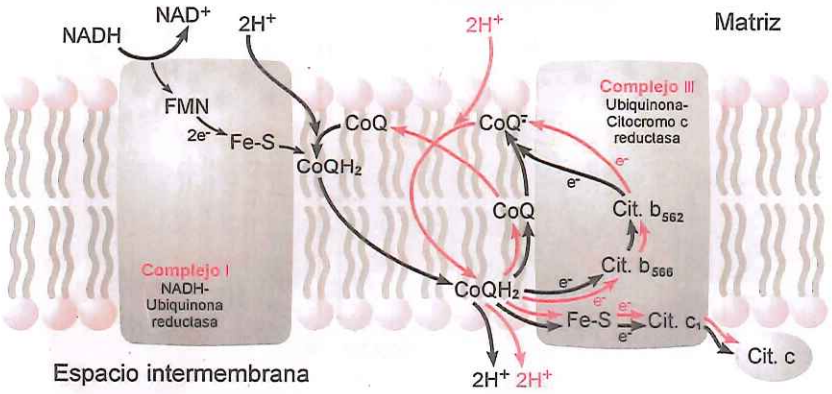


Fig. 9-15. Ciclo Q. Las flechas en negro indican el recorrido de electrones y protones en la primera fase del ciclo. El de electrones y protones de la segunda etapa es representado por las flechas en rojo.

2. Se transfiere otro electrón, tomado por el Fe^{3+} (queda como Fe^{2+}).

3. El centro hemo-Cu fija una molécula de O_2.

4. Los iones Fe^{2+} y Cu^{+} ceden al oxígeno un electrón cada uno y se forma un *intermediario peroxi*.

5. Se escinde el intermediario y queda H_2O unida al Cu y el otro átomo de oxígeno forma con el Fe (Fe^{4+}) un *intermediario ferril*.

6. Ingresa el cuarto electrón y dos protones. Se liberan dos moléculas de agua y los iones Fe^{3+} y Cu^{2+}, oxidados, quedan listos para iniciar otro ciclo.

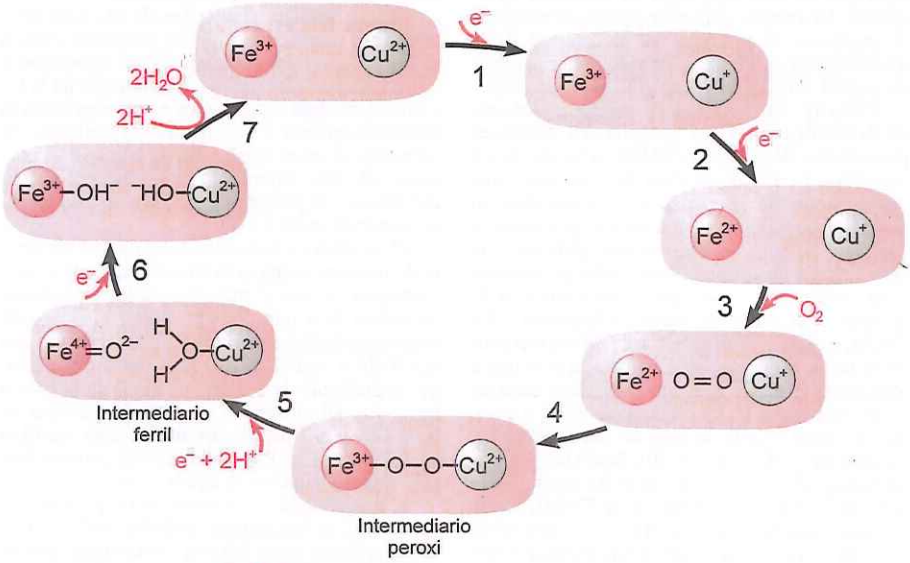


Fig. 9-16. Reducción de O_2 catalizada por citocromo oxidasa.

7. Se liberan dos moléculas de agua y los iones Fe^{3+} y Cu^{2+}, oxidados, quedan listos para iniciar otro ciclo.

Se ha discutido mucho acerca del número total de protones translocados desde la matriz hacia el lado citosólico de la membrana interna por cada par de electrones que se transfieren en la cadena respiratoria. El número más aceptado actualmente es de alrededor de 10 (2 o 4 en el complejo I, 4 en el III y 2 o 4 en el IV).

Como se ha indicado, la consecuencia del bombeo de protones es la creación de un gradiente de H^+ (de pH) y una diferencia de potencial eléctrico. Se genera una fuerza protón-motriz que tiende a hacer regresar los protones al interior de la mitocondria. Como la membrana es impermeable a los iones H^+, el flujo de retorno sólo puede producirse en sitios en los cuales existan estructuras que permitan el paso de protones, eludiendo la apolaridad de la doble capa lipídica. Estos sitios se encuentran en la porción F_0 de la ATP sintasa. El canal de protones es formado por las subunidades *c* y *a* del complejo F_0. (fig. 9-13). El ingreso de protones a favor de los gradientes de pH y potencial de membrana provee la energía necesaria para la síntesis de ATP.

Síntesis de ATP en el complejo F_0F_1

De las diferentes propuestas que intentan explicar el mecanismo de acoplamiento del retorno de protones con la síntesis de ATP, la más aceptada actualmente sostiene que F_0F_1 funciona como una "máquina rotatoria".

El flujo de protones ingresados al complejo F_0 desde el espacio intermembrana provee la energía necesaria para imprimir un movimiento de rotación al anillo de subunidades *c*. Como el tallo γ y el polipéptido ε están fijados al centro del anillo, rotan con él. Las subunidades α, β, δ, *a* y *b*, permanecen fijas.

Al girar el tallo γ en el centro del esferoide $\alpha_3\beta_3$, se producen contactos que inducen cambios conformacionales y módifican la afinidad de los sitios catalíticos por sus sustratos y productos. El sitio activo en cada polipéptido β pasa sucesivamente por tres estados: "abierto" (A), "laxo" (L) y "cerrado" (C). Existe un efecto cooperativo entre las subunidades que constituyen el hexámero, de modo que en todo momento los tres sitios catalíticos se encuentran con conformaciones diferentes. Al tiempo que en una de las subunidades β se muestra al estado "laxo", en la siguiente el sitio activo está "cerrado" y en la tercera "abierto".

ADP y P_i pueden ingresar en el estado "abierto" y de inmediato el sitio adquiere la conformación "laxa". Espontáneamente se produce una reacción con ΔG prácticamente cero, es decir, sin gasto energético, y se forma ATP que es firmemente retenido (estado "cerrado"). Posteriormente se vuelve a la forma "abierta", con liberación del ATP al medio (fig. 9-17). Cada vuelta completa de γ produce tres moléculas de ATP.

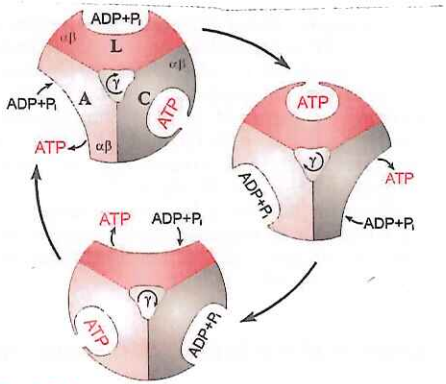


Fig. 9-17. ATP sintasa como máquina rotatoria para la síntesis de ATP. Corte transversal (muy esquemático). La rotación de la subunidad determina que el sitio catalítico en cada unidad β del complejo F_1 pase sucesivamente por tres conformaciones: laxa (L), cerrada (C) y abierta (A). En un giro completo se liberan tres moléculas de ATP.

La rotación y los cambios conformacionales son impulsados por la energía generada por el flujo de H^+; el ciclo se repite en forma continua mientras ingresen protones a través de los canales de F_0.

Transporte ATP-ADP

La mayor parte del ATP generado en células de eucariotas es sintetizada dentro de las mitocondrias y consumida fuera de ellas. Por esta razón casi todo el ATP formado debe ser enviado al exterior de esas organelas, mientras los compuestos necesarios para regenerarlo (ADP y P_i) deben ingresar en la matriz.

Los tres adenilatos tienen carga, razón por la cual no difunden a través de la membrana. El transporte está a cargo de un translocador o sistema de contratransporte (pág. 206) que intercambia ATP de la matriz por ADP del exterior (fig. 9-18). El ATP tiene 4 cargas negativas y el ADP, 3; el intercambio tiende a neutralizar el gradiente eléctrico creado por el bombeo de protones. En otros términos, el potencial de la membrana interna, positivo fuera y negativo dentro, impulsa el intercambio ATP^{4-}/ADP^{3-}.

El transporte de P_i hacia el interior se realiza a través de otro translocador de membrana interna, también impulsado por el gradiente de protones. En este caso, el transporte de P_i puede interpretarse como un pasaje en el mismo sentido (hacia el interior) de P_i y H^+ o un intercambio P_i/OH^-. Se suele representar a este sistema como un contratransportador $H_2PO_4^-/OH^-$ (fig. 9-18).

Alrededor del 25% de la energía generada por la transferencia de electrones en la cadena respiratoria es utilizada para impulsar los contratransportes ATP^{4-}/ADP^{3-} y P_i^-/OH^-.

Rédito en ATP de la fosforilación oxidativa

Según se mencionó en una sección anterior, la producción de ATP se había considerado acoplada con reacciones altamente exergónicas en tres sitios de la cadena respiratoria. Estos son aproximadamente los mismos sitios donde se eyectan protones. Ahora se puede relacionar la síntesis de ATP con el flujo de protones, pero el acoplamiento se realiza en el complejo F_0F_1. Las mediciones de la cantidad de H^+ bombeados desde la matriz hacia el lado citosólico de la membrana interna de mitocondrias por cada par de electrones transportado, dan un total de alrededor de 10. Se ha determinado que la síntesis de una molécula de ATP requiere el flujo de 3 protones a través del complejo F_0F_1. Si se tiene en cuenta el requerimiento de un protón adicional para la translocación de un ATP (intercambio ATP^{4-}/ADP^{3-}) y otro para el intercambio P_i^-/OH^-, se calcula un rendimiento de alrededor de 2,5 moléculas de ATP por cada par electrónico que recorre toda la cadena, desde NADH hasta O_2. Cuando los electrones son cedidos por $FADH_2$, el rédito es de aproximadamente 1,5 ATP. De cualquier modo, a fin de simplificar cálculos, las estimaciones de rendimiento energético de reacciones metabólicas expuestas en los siguientes capítulos considerarán valores enteros de 3 y 2 moléculas de ATP por par de electrones donados por NADH y $FADH_2$ respectivamente.

Inhibidores de la fosforilación oxidativa

Los inhibidores del transporte de electrones presentados en una sección anterior afectan, como es lógico, la fosforilación oxidativa. Existen otros agentes que no bloquean el flujo de electrones, pero disocian a éste del proceso de fosforilación. Estos agentes son llamados *desacoplantes*.

Uno muy utilizado es el 2,4-dinitrofenol (DNP); transfiere iones hidrógeno desde el lado externo de la mitocondria hacia la matriz y anula el gradiente de protones creado por la cadena respiratoria. Los compuestos que transportan iones a través de la membrana son llamados *ionóforos*; el DNP se comporta como un ionóforo de protones.

Otro desacoplante es el salicilato (la aspirina es ácido acetil salicílico). Cuando atraviesa la membrana externa de mitocondrias, el salicilato

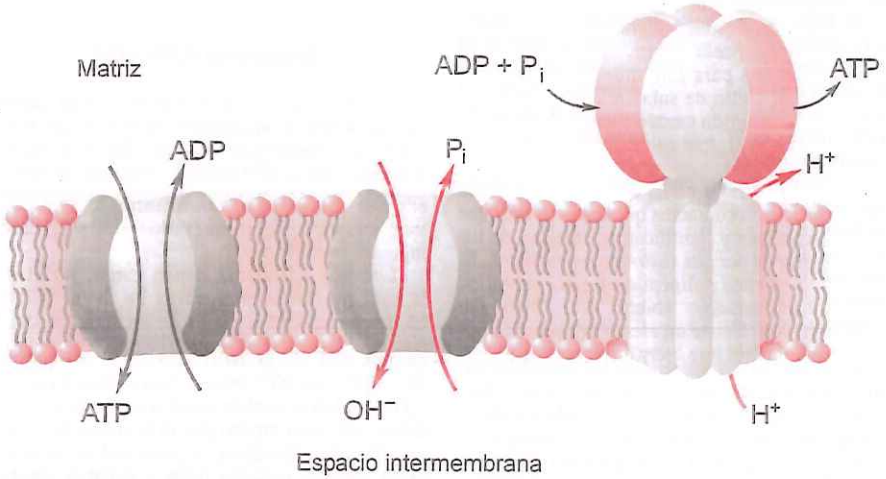


Fig. 9-18. El retorno de protones a través del complejo F_1F_0 (a la derecha) promueve la síntesis de ATP. A la izquierda y centro se han representado intercambiadores ADP/ATP y P_i/OH^- respectivamente.

encuentra en el espacio intermembrana un pH bajo, adquiere un protón y se convierte en ácido salicílico sin carga, que pasa fácilmente la membrana interna. En la matriz el pH es alto y el ácido salicílico libera un protón. Esto tiende a reducir el gradiente a través de la membrana interna y disminuye el flujo de protones por los canales F_0F_1 e inhibe la síntesis de ATP.

Existen antibióticos de naturaleza peptídica, por ejemplo *valinomicina* y *nigericina*, que actúan como ionóforos de K^+. La transferencia de K^+ puede suprimir, o al menos disminuir, el gradiente de potencial eléctrico a ambos lados de la membrana y entorpecer la fosforilación acoplada al ingreso de protones.

Otra sustancia que interfiere la fosforilación oxidativa es el antibiótico *oligomicina*, el cual se une específicamente a una de las proteínas del segmento F_0 del complejo de síntesis de ATP.

Los desacoplantes no interfieren el transporte de electrones. Normalmente cerca del 40% de la energía liberada por las oxidaciones en la cadena respiratoria es aprovechada en la síntesis de ATP y el 60% restante se desprende como calor para el mantenimiento de la temperatura corporal. El desacoplamiento se manifiesta por hiperpirexia, que es uno de los síntomas de intoxicación con altas dosis de ácido salicílico o aspirina.

El *síndrome de Reye* es un cuadro clínico raro que afecta sobre todo a niños, en el cual hay una alteración mitocondrial con inhibición de la fosforilación oxidativa y de la oxidación de ácidos grasos. Puede ser una complicación de infecciones virales comunes (influenza, varicela), o de intoxicaciones con salicilatos. Se manifiesta por degeneración hepática, encefalopatía con edema cerebral no inflamatorio y sarpullido en la piel.

Las mitocondrias no solo son responsables de la generación de ATP, sino también participan en apoptosis (Cap. 32) y en la regulación de la homeostasis de Ca^{2+} en la célula, de modo que los defectos de estas organelas pueden afectar esos procesos.

Control respiratorio

Como todos los procesos metabólicos, la fosforilación oxidativa requiere la presencia en el medio de concentraciones adecuadas de los sustratos necesarios, que incluyen ADP, P_i, O_2 y un metabolito oxidable, capaz de ceder electrones a NAD o FAD. Cuando disminuye la disponibilidad de cualquiera de estos cuatro factores, se limita la síntesis de ATP. El nivel de ADP en la matriz mitocondrial es muy importante como regulador de la fosforilación oxidativa. Cuando no hay ADP, la respiración se detiene. En presencia de oxígeno y con provisión adecuada de sustratos oxidables, la actividad respiratoria de las mitocondrias depende de la cantidad de ADP disponible. Este efecto exige una estrecha relación entre el transporte de electrones y la fosforilación y ha sido denominado *control respiratorio*. Obviamente, la síntesis de ATP depende del flujo continuo de electrones desde un sustrato oxidable hasta O_2. Por otro lado, en mitocondrias intactas, el flujo de electrones ocurre sólo mientras se sintetiza ATP. Esto se explica por el acoplamiento existente entre transporte de electrones y bombeo de protones a través de la membrana interna. La fuerza protón-motriz es responsable de la síntesis de ATP. Si los protones externos no pueden retornar a la matriz por el canal de la pieza F_0, se detiene no sólo la producción de ATP en el complejo F_0F_1, sino también el pasaje de electrones a través de la cadena respiratoria, ya que al no volver protones a la matriz, su acumulación en el exterior de la membrana incrementaría el gradiente y tornaría muy costosa, desde el punto de vista energético, la transferencia de protones adicionales; el bombeo cesaría.

Este mecanismo regulatorio tiene por finalidad limitar las oxidaciones a los requerimientos fisiológicos de ATP de las células e impedir el consumo inútil de sustratos.

La cadena respiratoria tiene gran capacidad de respuesta y reacciona muy rápidamente a cualquier demanda. En general, el sistema mantiene altos niveles de ATP en las células. La estimulación de una actividad que consume ATP, por ejemplo la contracción muscular, aumenta de inmediato la producción de ADP. El incremento del nivel de ADP en la célula activa la oxidación de sustratos, el transporte de electrones, el bombeo de protones, el flujo de H^+ a través del complejo F_0F_1 y, con ello, la producción de ATP.

El translocador ATP/ADP es inhibido por un glucósido vegetal llamado *atractilósido*. Este compuesto bloquea el ingreso de ADP, reduce o anula el principal estímulo de la respiración y detiene el transporte de electrones.

Cuando se desacopla la fosforilación por acción de agentes como el DNP, el control respiratorio desaparece. En estos casos, como el transporte de electrones continúa sin producción de ATP, toda la energía liberada se disipa en forma de calor.

Deficiencias genéticas de la cadena respiratoria

La gran mayoría de las proteínas mitocondriales son codificadas por genes nucleares; muy

poco más del 3% de todas las proteínas dependen de genes propios de la organela. Esto hace que las deficiencias tengan diferentes modos de herencia. El genoma mitocondrial procede de la madre; el padre nunca transmite su ADN mitocondrial (mitADN) a los hijos. Además, no siempre las mitocondrias tienen ADN idéntico (homoplasmia) y en algunos casos se presentan mutaciones en su ADN (heteroplasmia).

Los defectos genéticos de la fosforilación oxidativa producen una variedad de síntomas clínicos en niños antes de los dos años de edad, frecuentemente existe con compromiso renal, el cual en algunos casos consiste en tubulopatía proximal (síndrome de de Toni-Debré-Fanconi), o en otros alteración de los glomérulos y túbulos. A veces, los pacientes presentan elevados niveles de lactato en plasma. Defectos en los diferentes complejos, especialmente el IV o citocromo c oxidasa, son causa del mal funcionamiento de la cadena respiratoria y pueden ser responsables del llamado síndrome de Leigh, con trastornos neurológicos y motores muy severos que llevan a la muerte en los dos primeros años, principalmente por falla respiratoria. Se estima que el 25% de los casos de síndrome de Leigh se debe a fallas en proteínas mitocondriales.

Grasa parda

En el recién nacido y en muchos animales, especialmente aquellos que experimentan períodos de hibernación, existen depósitos de un tejido llamado *grasa parda*, (*brown fat* en inglés), cuyo color se debe a la gran cantidad de mitocondrias. En niños de corta edad se ha demostrado la existencia de depósitos de grasa parda en la región interescapular. Estos depósitos disminuyen y desaparecen en adultos. Las mitocondrias de este tejido no realizan fosforilación oxidativa a pesar de tener un flujo de electrones particularmente intenso. Funcionan como si estuviesen bajo el efecto de desacoplantes debido a la presencia de *termogenina* en la membrana interna. La termogenina o proteína desacoplante (UCP, del inglés *uncoupling protein*) actúa como transportador de protones. Esta vía alternativa del flujo de protones, no acoplada a síntesis de ATP, es activada por ácidos grasos libres. La energía producida por el transporte de electrones se irradia como calor y sirve para mantener la temperatura corporal.

En tejido adiposo blanco de ratones se ha demostrado la existencia de adipocitos que expresan termogenina en respuesta a diversos estímulos, a los cuales se los ha designado células *beige*. Los estudios en curso no han aportado todavía evidencias firmes de su presencia en humanos.

El interés médico de las células pardas y beige surge de la comprobación en ratones de su capacidad para contrarrestar ciertas enfermedades metabólicas, como obesidad y diabetes tipo 2.

Sistemas conmutadores de hidrógeno

Al considerar el funcionamiento de la cadena respiratoria, se indicó que los hidrógenos de sustratos oxidados en reacciones catalizadas por enzimas dependientes de NAD son transferidos al primer complejo del sistema de transporte electrónico (NADH-ubiquinona reductasa) y a partir de allí continúa el camino que los llevará, a través de una serie de etapas, a unirse con oxígeno para formar agua.

El NADH que participa en dichas reacciones debe encontrarse en la matriz mitocondrial a fin de ceder los hidrógenos a la cadena respiratoria, localizada en la membrana interna de la organela.

Existen también reacciones catalizadas por oxidorreductasas dependientes de NAD, que tienen lugar en el citosol. El NADH formado en esas reacciones no puede transferir directamente sus equivalentes de reducción a la cadena respiratoria, pues la membrana interna de la mitocondria no es permeable a los nucleótidos de nicotinamida. La cantidad de NAD en el citosol es limitada y si no existiesen mecanismos para reoxidar el NADH resultante de las reacciones en las cuales participa esa coenzima, la capacidad para oxidar ciertos sustratos se vería muy reducida. Por ejemplo, durante la glucólisis, en la etapa de oxidación del gliceraldehído-3-fosfato por gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, se produce $NADH^+ H^+$. En anaerobiosis, la reoxidación del NADH tiene lugar en la reacción de conversión de piruvato en lactato catalizada por lactato deshidrogenasa. En aerobiosis, en cambio, el piruvato penetra en la mitocondria para continuar su camino oxidativo y el NADH queda en el citosol. En estas condiciones, la degradación de la glucosa estaría limitada por la disponibilidad de NAD oxidado. Si toda la coenzima citosólica se reduce, la glucólisis no puede proseguir.

La impermeabilidad de la membrana mitocondrial interna al NADH exige la existencia de sistemas de transferencia indirecta, llamados *sistemas lanzadera* o *conmutadores*, que hagan llegar los equivalentes de reducción a la cadena respiratoria.

El funcionamiento de estos sistemas requiere: 1) presencia en citosol de una oxidorreductasa dependiente de NAD capaz de reoxidar el NADH, transfiriendo los hidrógenos a un sustra-

to aceptor; 2) el sustrato aceptor debe contar con un sistema de transporte que le permita atravesar la membrana interna de la mitocondria; 3) el aceptor debe ceder los equivalentes de reducción a la cadena respiratoria en la mitocondria, para lo cual es necesaria la existencia en la organela de una enzima capaz de oxidarlo.

Conmutador glicerofosfato. El primero de estos sistemas descripto en la literatura fue el de *glicerofosfato*, presente en músculo esquelético y cerebro, que funciona según se esquematiza en la figura 9-19.

a) El sustrato aceptor de los hidrógenos es la dihidroxiacetonafosfato. En reacción catalizada por la glicerofosfato deshidrogenasa, enzima citosólica ligada a NAD, los hidrógenos del NADH son transferidos a dihidroxiacetonafosfato para formar glicerol-3-fosfato.

b) En la cara externa de la membrana interna de mitocondrias existe una glicerofosfato deshidrogenasa ligada a FAD. Gracias a esta localización, el glicerol-3-fosfato formado en el citosol no necesita penetrar en la matriz para ser oxidado a dihidroxiacetonafosfato y transferir sus hidrógenos a FAD.

c) El $FADH_2$ cede los equivalentes de reducción a ubiquinona.

En este sistema los equivalentes de reducción ingresan en la cadena respiratoria a nivel de coenzima Q, razón por la cual el rendimiento en términos de ATP será de 2 moléculas por cada par de electrones.

Conmutador aspartato-malato. Otro sistema conmutador de hidrógenos muy activo en hígado, riñón y corazón, es la llamada *lanzadera aspartato-malato* (fig. 9-20). Están involucradas en la misma las isozimas citosólica y mitocondrial de aspartato aminotransferasa y malato deshidrogenasa y opera según la siguiente serie de etapas:

a) Por transaminación entre L-aspartato y α-ceto-glutarato catalizada por aspartato aminotransferasa citosólica, se forman L-glutamato y oxaloacetato.

b) El oxaloacetato, en reacción catalizada por malato deshidrogenasa citosólica, acepta dos hidrógenos de NADH citoplasmático. Como productos se forman NAD^+ y malato. El malato penetra en la matriz por el sistema transportador de dicarboxilatos de membrana interna.

c) Dentro de la mitocondria, el malato es oxidado a oxaloacetato por malato deshidrogenasa mitocondrial, cediendo sus hidrógenos a NAD de la matriz. El NADH formado transfiere equivalentes de reducción al sistema transportador de electrones en membrana interna.

d) El oxaloacetato participa en una reacción de transaminación con L-glutamato, catalizada por aspartato aminotransferasa mitocondrial, que forma L-aspartato y α-cetoglutarato.

e) El aspartato y el α-cetoglutarato disponen en la membrana interna de sistemas de transporte que les permiten salir hacia el citosol. A su

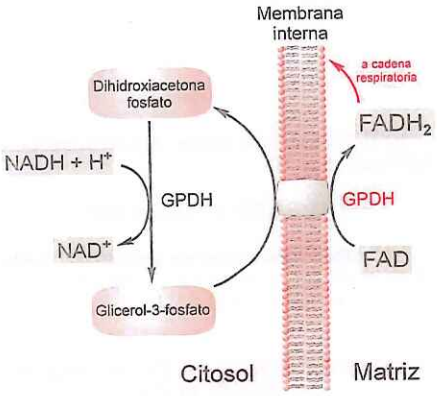


Fig. 9-19. Representación del sistema conmutador de hidrógeno de glicerofosfato. GPDH: glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. En negro, enzima citosólica; en rojo, la mitocondrial.

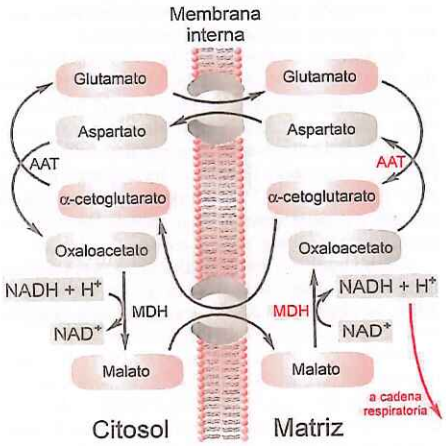


Fig. 9-20. Representación del sistema conmutador de hidrógeno aspartato-malato. AAT: aspartato aminotransferasa; MDH: malato deshidrogenasa. En negro, enzimas citosólicas; en rojo, mitocondriales.

vez, el L-glutamato citosólico puede ingresar en la matriz.

Se cierra así un ciclo que permite transferir hidrógenos de NADH desde el citosol a la cadena respiratoria, con malato como intermediario portador. En este caso, los hidrógenos son recibidos en la matriz mitocondrial por NAD; por lo tanto, el par de equivalentes de reducción generará 3 moléculas de ATP cuando sea transferido a la cadena respiratoria.

Además de los dos sistemas descriptos, existen otros, entre ellos el de citrato-piruvato. Funciona en la transferencia de acetilos desde matriz a citosol (pág. 307) y también actúa como lanzadera de hidrógenos.

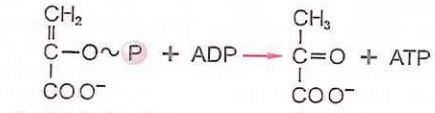
Hay cierta especificidad tisular de las lanzaderas; por ejemplo, la de aspartato-malato es muy activa en hígado, riñón y corazón, la de glicerofosfato, en cerebro y músculo esquelético.

FOSFORILACIÓN A NIVEL DE SUSTRATO

La utilización de diversas sustancias en las células a los fines de aprovechar la energía que contienen, generalmente se produce a través de una serie de transformaciones químicas. En la primera de esas reacciones se forma un compuesto intermedio, el cual pasa a la siguiente etapa para dar otro producto intermedio, que a su vez sufrirá la próxima reacción y así sucesivamente hasta obtener el producto final. Esta secuencia ordenada de transformaciones químicas recibe el nombre de *vía metabólica*.

En algunas de estas vías, los cambios producidos en la molécula del sustrato original conducen a redistribuir la energía contenida en la misma y a crear enlaces con alta energía de hidrólisis en algunos de los compuestos intermedios. Estos compuestos reaccionan directa o indirectamente con ADP para formar ATP. Este tipo de transferencia de energía, sin participación de la cadena respiratoria, es denominado *fosforilación a nivel de sustrato*.

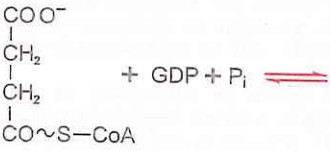
Como ejemplo de fosforilación a nivel de sustrato por transferencia directa de un fosforilo al ADP, se citará una de las etapas de degradación de la glucosa en la vía metabólica conocida como glucólisis. Un intermediario de esa vía, el 2-fosfoenolpiruvato, es un compuesto de alta energía. La energía libre estándar de la hidrólisis del grupo fosfato en este compuesto es de –14,8 kcal/mol o –61,9 kJ/mol. A ella se acopla fosforilación de ADP para formar ATP, reacción endergónica con un $\Delta G^{\circ\prime}$ de + 7,3 kcal/mol o +30,5 kJ/mol. El fosforilo es transferido directamente al ADP en reacción catalizada por *piruvato quinasa*:



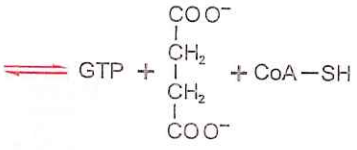
Fosfoenol piruvato Piruvato

$\Delta G^{\circ\prime} = -7{,}5$ kcal/mol (–31,4 kJ/mol)

Un caso de transferencia indirecta de energía a ADP ocurre en la vía metabólica llamada *ciclo de Krebs* o *de ácido cítrico*, durante el cual los restos de degradación de carbohidratos, lípidos y aminoácidos son convertidos en CO_2 y H_2O. En dicho ciclo, una de las etapas comprende la formación de un compuesto intermedio de alta energía, succinil-coenzima A. Este metabolito reacciona con guanosina difosfato (GDP) y fosfato inorgánico (P_i). La energía es transferida para formar un enlace ~Ⓟ y sintetizar guanosina trifosfato (GTP). La reacción es catalizada por *succinato tioquinasa*.



Succinil-CoA



Succinato

El GTP, a su vez, puede transferir fosfato a ADP para dar ATP:

$$GTP + ADP \rightleftharpoons GDP + ATP$$

La fosforilación a nivel de sustrato, a diferencia de la oxidativa, no requiere presencia de oxígeno para la formación de ATP.

OTROS SISTEMAS DE TRANSPORTE DE ELECTRONES

Existen sistemas de transporte de electrones distintos de la cadena respiratoria que no participan en síntesis de ATP, sino en diversas reaccio-

nes cuyo resultado es hidroxilación o deshidrogenación del sustrato.

En el caso de las hidroxilaciones, los sistemas requieren NADPH y O_2. Uno de los átomos de la molécula de oxígeno es incorporado al sustrato y el otro es reducido a H_2O. El proceso puede representarse por la ecuación (A: sustrato):

$$AH + O_2 + NADPH + H^+ \longrightarrow AOH + H_2O + NADP^+$$

Las enzimas que catalizan estas reacciones son designadas *monooxigenasas* u *oxigenasas de función mixta*.

La introducción de un grupo -OH es un recurso comúnmente utilizado en células hepáticas como mecanismo de desintoxicación de sustancias extrañas. En hepatocitos existe un sistema de transporte electrónico responsable de hidroxilaciones. Se encuentra firmemente unido al retículo endoplásmico y se lo puede aislar en la fracción microsomal. El sistema contiene una flavoproteína con FAD, llamada *NADPH-citocromo P_{450} reductasa* y citocromo P_{450}. El citocromo P_{450} es una hemoproteína de unos 50 kDa, anclada en membranas, que pertenece a los citocromos *b*; tiene su máximo de absorción a 450 nm cuando está unido a CO. En humanos existe una familia muy numerosa de genes que codifican para enzimas P_{450} de distinta especificidad. Algunas de ellas actúan sobre una variedad de sustratos.

El NADPH cede equivalentes de reducción a NADPH-citocromo P_{450} reductasa y ésta transfiere electrones al citocromo P_{450}, que en el paso final actúa como oxigenasa de función mixta, catalizando la adición de un grupo hidroxilo al sustrato. El sistema es inducible, es decir, la cantidad de sus componentes aumenta notablemente en hepatocitos cuando se administran sustratos hidroxilables.

En mitocondrias de corteza adrenal existe un sistema de hidroxilación que recibe hidrógenos de NADPH para la síntesis de hormonas esteroides a partir de colesterol. Los electrones son cedidos a una flavoproteína llamada *NADPH-adrenodoxina reductasa*, que los transfiere a una proteína con hierro no hemínico designada *adrenodoxina*. Esta a su vez reduce al citocromo P_{450}, el cual cataliza la activación final de O_2 y la hidroxilación del sustrato.

En retículo endoplásmico de células hepáticas se encuentra otro sistema de transporte de electrones encargado de la desaturación de ácidos grasos. Está compuesto por una flavoproteína con FAD, NADH-citocromo b_5 reductasa, citocromo b_5 y una desaturasa. Los equivalentes de reducción son provistos por NADH y fluyen por el sistema para ser finalmente transferidos al O_2 junto con los 2 H sustraídos al sustrato; se forman dos moléculas de agua, y se crea una doble ligadura en la cadena carbonada del ácido graso.

RESUMEN

Comúnmente las oxidaciones biológicas no se realizan por transferencia directa a oxígeno de los electrones sustraídos al sustrato; se efectúan en etapas en las que participan distintos aceptores de e^- de potencial de reducción creciente. La energía se libera en forma fraccionada y puede ser captada y utilizada por las células. Los aceptores de hidrógeno y/o electrones (H y e^- son llamados *equivalentes de reducción*) se disponen ordenadamente, de menor a mayor potencial de reducción, asociados a enzimas que catalizan la transferencia de e^-. El conjunto recibe el nombre de *cadena respiratoria* o *cadena de transporte de electrones* y se encuentra en membrana interna de mitocondrias. En matriz mitocondrial se encuentran deshidrogenasas ligadas a NAD. Generan NADH + H^+. Los hidrógenos son cedidos por la coenzima a la cadena respiratoria, integrada por los siguientes componentes: *Complejo I* o *NADH-ubiquinona reductasa* (45 polipéptidos, FMN y 7 a 9 centros Fe-S). Los equivalentes de reducción de NADH son captados por coenzima FMN, que se convierte en $FMNH_2$; los e^- pasan sucesivamente por los centros Fe-S. Por fin los e^- son cedidos a coenzima Q. Se reoxidan el $FMNH_2$ y los átomos de Fe^{2+} y se reduce CoQ a $CoQH_2$. *Complejo II* o *succinato-ubiquinona reductasa* (4 polipéptidos, FAD y 3 centros Fe-S). Recibe 2 H de succinato y los transfiere a CoQ. *Coenzima Q* o *ubiquinona*: es el único aceptor del sistema no unido a proteína; se aloja en la bicapa lipídica de la membrana y actúa como portador móvil de e^-. Recibe hidrógenos transferidos desde los complejos I o II. La $CoQH_2$ cede e^- al *complejo III* o *ubiquinona-citocromo c reductasa* (citocromos b_{566}, b_{562} y c_1 y un centro Fe-S). Los citocromos son hemoproteínas en las cuales el Fe capta reversiblemente un electrón. Desde ubiquinona-citocromo *c* reductasa los e^- son transferidos al citocromo *c*. *Citocromo c*: ubicado sobre la cara exterior de la membrana. Entrega e^- al *complejo IV* o *citocromo oxidasa* (citocromos *a* y a_3, dos átomos de Cu). Transfiere electrones al O_2. Una molécula de oxígeno capta 4 e^-, se une a 4 H^+ y da 2 H_2O. *Inhibidores*: rotenona, amital y otros barbitúricos actúan a nivel del complejo I; antimicina A, en el III; cianuros, monóxido de carbono y azidas sobre complejo IV.

Fosforilación oxidativa. La energía producida por el flujo de electrones es acoplada a transferencia de fosforilos para la síntesis de ATP a partir de ADP. Cada par de e^- procedentes de sustratos deshidrogenados por enzimas ligadas a NAD genera 3 moléculas de ATP. Dos e^- de sustratos oxidados por enzimas dependientes de FAD producen 2 moléculas de ATP. En el primer caso, la relación P:O es 3, en el segundo, 2. *Hipótesis quimio-osmótica*. Explica el me-

canismo de la fosforilación oxidativa. La energía generada por el flujo de equivalentes de reducción es utilizada para "bombear" protones desde matriz mitocondrial hacia el exterior de la membrana interna. La expulsión de protones se produce en los sitios de la cadena correspondientes a los complejos I, III y IV. Se crea un gradiente de protones entre ambas caras de la membrana; el pH es menor y el potencial eléctrico es más positivo en el lado externo. La síntesis de ATP se realiza en las partículas submitocondriales, formadas por 9 subunidades polipeptídicas (porción F_1 del complejo ATP sintasa) y fijadas a la cara interna de la membrana por un tallo hueco que atraviesa la bicapa lipídica (segmento F_0). Los gradientes de $[H^+]$ y de potencial eléctrico creados por el bombeo tienden a hacer fluir protones espontáneamente hacia el interior. Como la membrana es impermeable a H^+, su regreso a la matriz sólo puede realizarse a través de los canales de F_0. El complejo F_1F_0 (máquina rotatoria) produce unión de Pi a ADP para formar ATP con la energía liberada por el flujo de retorno de H^+ (potencial protón-motriz). La fosforilación oxidativa es inhibida por agentes desacoplantes, como 2,4-dinitrofenol, que actúan como ionóforos de protones. Los antibióticos valinomicina y nigericina son ionóforos de K^+ y suprimen el gradiente de potencial eléctrico. La oligomicina inhibe la fosforilación oxidativa; se une al segmento F_0.

El nivel de ADP es el principal factor regulador de la fosforilación oxidativa. Cuando no hay ADP, las oxidaciones se detienen. Si se desacopla la fosforilación mediante agentes como DNP, el control respiratorio desaparece; los e^- fluyen activamente, pero no se sintetiza ATP; toda la energía liberada irradia como calor. Existe un tejido, la *grasa parda*, cuyas mitocondrias funcionan desacopladas; su función es termogénica.

Intercambiadores ADP/ATP, P_i /OH^- en membrana interna introducen ADP y Pi en la matriz.

Fosforilación a nivel de sustrato. Genera ATP en reacciones en las cuales el potencial de transferencia de grupos fosforilo a ADP es provisto directamente por metabolitos de alta energía. Otros sistemas de transporte electrónico que no forman ATP catalizan hidroxilaciones. Son *oxigenasas de función mixta*, requieren NADPH y O_2. En retículo endoplásmico de hígado hay un sistema formado por NADPH-citocromo P_{450} reductasa y citocromo P_{450}. En mitocondrias de corteza adrenal, un sistema similar interviene en la síntesis de hormonas esteroides. La desaturación de ácidos grasos es catalizada por un sistema de retículo endoplásmico de hepatocitos, integrado por NADH-citocromo b_5 reductasa, citocromo b_5 y desaturasa.

BIBLIOGRAFÍA

Boyer P.D. (1997). The ATP synthase. A splendid molecular machine. *Annual Review of Biochemistry*, 66: 717-749.

Cannon B., Nedergaard J. (2004). Brown adipose tissue: Function and physiological significance. *Physiological Reviews*, 84: 277-359.

Capaldi R.A., Aggeler R. (2002). Mechanism of the F_1F_0-type synthase, a biological rotary motor. *Trends in Biochemical Sciences*, 27: 154-160.

Cechini G. (2003). Function and structure of complex II of the respiratory Chain. *Annual Review of Biochemistry*, 72: 77-109.

Claypool S.M., Koehler C.M. (2012). The complexity of cardiolipin in health and disease. *Trends in Biochemical Sciences*, 37: 32-41.

Cross R.L. (2004). Turning the ATP motor. *Nature*, 427: 407-408.

Harms M., Seale P. (2013). Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature Medicine*, 19: 1252-1263.

Hosler J.P., Ferguson-Millers S., Mills S., Mills D.S. (2006). Energy transduction: Proton transfer through the respiratory complexes. *Annual Reviews of Biochemistry*, 75: 165-187.

Isaac I.S., Dawson J.H. (1999). Haem-iron containing peroxidases. *Essays in Biochemistry*, 34: 51-69.

Mitochondria dysfunction in human disease. Serie de artículos. (1999). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1410: 99-228.

Ricquier D. (1998). Neonatal brown adipose tissue, UCP1 and the novel uncoupling proteins. *Biochemical Society Transactions*, 26: 120-123.

Roehm K.H. (2001). Electron carriers: proteins and cofactors in oxidative phosphorylation. En: *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Inc., Wiley InterScience, www.els.net.

Sligar S.G. (1999). Nature's universal oxygenases: the cytochrome P_{450}. *Essays in Biochemistry*, 34: 71-83.

CAPÍTULO 10

Antioxidantes

El metabolismo normal genera productos con actividad oxidante que, si no son eliminados o neutralizados, reaccionan con moléculas del propio organismo causando alteraciones que perturban su funcionamiento. El mismo efecto tóxico ejercen diversos contaminantes del ambiente. Un exceso de agentes oxidantes lleva a lo que se ha dado en llamar *estrés oxidativo*.

A fin de neutralizar o eliminar esos productos y contrarrestar su acción deletérea, los seres vivientes han desarrollado sistemas de defensa que procuran mantener el equilibrio entre factores pro-oxidantes y antioxidantes.

Se presenta aquí una visión integrada del tema, considerando el origen y acción de esos agentes nocivos y los mecanismos protectores con que cuenta el organismo.

ESPECIES REACTIVAS

Los productos tóxicos responsables de daño oxidativo en las células comprenden las llamadas *especies reactivas de oxígeno* (en inglés se las designa con las siglas ROS, de *reactive oxygen species*) y las *especies reactivas de nitrógeno* (RNS). Ambas incluyen radicales libres y diversas sustancias que, aunque no son radicales, son muy reactivas y tienen capacidad oxidante.

Un *radical libre* es un átomo o un grupo de átomos que posee, en orbitales externos, uno o más electrones no apareados. Se representan con un punto junto al o a los símbolos de los elementos constituyentes ($^{\bullet}$A o A$^{\bullet}$).

Algunos radicales libres tienen una vida media relativamente larga porque son menos reactivos, pero muchos son muy inestables; su duración puede alcanzar a microsegundos, ya que tienden a reaccionar rápidamente a fin de obtener el electrón que les falta. La molécula que reacciona con el radical, al perder un electrón, se convierte a su vez en otro radical. Este puede actuar sobre una nueva molécula, y así sucesivamente. Se habla de reacciones autopropagante o *en cadena*.

Por ejemplo, si un radical A$^{\bullet}$ reacciona con la molécula B:

$$A^{\bullet} + B: \rightarrow A: + B^{\bullet}$$

Se forma el radical B$^{\bullet}$, que propaga la reacción:

$$B^{\bullet} + C: \rightarrow B: + C^{\bullet}$$

C$^{\bullet}$ puede reaccionar con otra molécula y continuar la generación de radicales.

La reacción en cadena se interrumpe cuando el radical neoformado es poco reactivo o cuando dos radicales libres se neutralizan mutuamente:

$$A^{\bullet} + B^{\bullet} \rightarrow A:B$$

Las especies reactivas se generan principalmente en organelas como peroxisomas, mitocondrias y retículo endoplásmico de todas las células.

En la cadena respiratoria, por ejemplo, la reacción catalizada por citocromo oxidasa, con incorporación al oxígeno de un electrón por vez, puede dar productos de reducción parcial y formar radicales libres.

Otro ejemplo de formación de especies reactivas es el provocado por el ingreso al organismo de bacterias, virus u otras partículas extrañas.

Esto promueve una reacción que se inicia con la liberación de citoquinas y otros factores que desencadenan un proceso inflamatorio. Hacia el sitio afectado son atraídas, y luego activadas, células fagocíticas (neutrófilos, monocitos y macrófagos) que engloban al agente extraño. En estas células se produce entonces una verdadera "explosión respiratoria" (en inglés *respiratory burst*), con gran consumo de oxígeno y formación de especies reactivas. La producción exagerada de esas especies tiende a destruir al invasor, pero también puede dañar células y estructuras normales vecinas al foco de inflamación.

Otra causa de generación de especies reactivas es la exposición a agentes externos como por ejemplo contaminantes del ambiente (humo de tabaco, pesticidas, productos de combustión y desechos industriales), drogas, radiaciones ionizantes en general, ozono, altas concentraciones de oxígeno.

Especies reactivas de oxígeno

Se forman en el organismo y comprenden compuestos no radicales y radicales libres. Los no radicales son el oxígeno singulete y el peróxido de hidrógeno. Entre los radicales se cuentan el anión superóxido, los peróxidos y el radical hidroxilo.

Oxígeno singulete. La molécula de oxígeno (O_2) en su forma más común o estado basal, tiene dos electrones no apareados, con *spin* paralelo, uno en cada uno de dos orbitales externos. Es decir, el oxígeno basal es un birradical, al cual se lo llama *oxígeno triplete* (del inglés *triplet oxygen*) y se lo indica con la notación $^3O_2$. A diferencia de muchos radicales libres, el oxígeno en estado basal reacciona muy lentamente, ya que para aceptar un par de electrones de un sustrato, uno de los electrones debe invertir su *spin*, lo cual representa una barrera termodinámica. Esto explica por qué la materia orgánica no entra en combustión espontánea en contacto con oxígeno.

Si se suministra suficiente energía para invertir el *spin* de uno de los electrones no apareados del oxígeno triplete, éste pasa al estado *singulete* o *singlete* (términos usados como traducción del vocablo inglés *singlet*) que se representa con la notación $^1O_2$; puede producirse a partir de oxígeno triplete en algunas reacciones biológicas, como peroxidación de lípidos o durante la explosión respiratoria en fagocitos y también por absorción de energía lumínica. Aunque no es un radical, el $^1O_2$ es mucho más reactivo que el oxígeno triplete y puede causar daño. El exceso de energía del oxígeno singulete es fácilmente transferido a otras moléculas y entonces el $^1O_2$ vuelve al estado "relajado", triplete, o basal.

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Aunque no es un radical, esta es una molécula reactiva. Participa en combinaciones que dan lugar a productos aún más reactivos. Atraviesa fácilmente las membranas celulares y puede actuar en lugares alejados de su sitio de origen. En el organismo se genera comúnmente en reacciones catalizadas por oxidasas. Su producción es particularmente abundante en peroxisomas durante la degradación de ácidos grasos de cadena muy larga (mayor de 20 carbonos) y otros compuestos.

En células fagocíticas, por acción de la mieloperoxidasa activada durante la explosión respiratoria, se produce peróxido de hidrógeno que puede reaccionar con iones cloruro para producir poderosos oxidantes y bactericidas, como el ácido hipocloroso (hipoclorito, ClO^-) y el radical hidroxilo.

$$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HClO + {}^{\bullet}OH$$

Anión superóxido. Es un radical libre, resultado de la reducción incompleta del oxígeno (una molécula de oxígeno adquiere un electrón). Se lo representa con la notación $^{\bullet}O_2^-$. No es particularmente dañino por sí, pero es precursor de otros agentes oxidantes altamente reactivos.

Debido a su carga electronegativa no es soluble en lípidos ni difunde fácilmente a través de membranas. Sin embargo, puede actuar a distancia gracias a la existencia de transportadores de aniones que permiten su paso.

La cadena respiratoria accidentalmente deja escapar electrones que resultan en reducción parcial de la molécula de oxígeno. Los complejos I y III son sitios importantes de generación de superóxido. También se puede producir en la etapa final catalizada por *citocromo oxidasa*, o por pasaje al oxígeno de un electrón desde la coenzima Q en su forma radical semiquinona ($CoQH^{\bullet}$):

$$CoQH^{\bullet} + O_2 \rightarrow CoQ + H^+ + {}^{\bullet}O_2^-$$

Se genera anión superóxido en reacciones del O_2 con diferentes compuestos, como catecolaminas (dopamina, adrenalina) o tetrahidrofolato. Enzimas del retículo endoplásmico asociadas a citocromo P_{450} que catalizan reacciones de hidroxilación de diversos sustratos (ácidos grasos, esteroides, xenobióticos) producen radicales superóxido. Se forma en abundancia durante la explosión respiratoria en fagocitos, principalmente por acción de *NADPH oxidasa*:

$$NADPH + O_2 \rightarrow NADP^+ + H^+ + {}^{\bullet}O_2^-$$

Probablemente su acción tóxica principal es ejercida a través de los radicales hidroxilo (•OH) que se forman a partir de superóxido y peróxido de hidrógeno en la reacción de Haber-Weiss:

$$^{\bullet}O_2^- + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^- + {}^{\bullet}OH$$

También produce especies reactivas de nitrógeno (ver más adelante).

Radical hidroxilo. Se puede generar en la reacción de Haber-Weiss o, en presencia de Fe^{2+} u otro metal de transición, por la llamada reacción de Fenton:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + {}^{\bullet}OH$$

Se forma además por exposición a rayos γ.

Este radical libre atraviesa fácilmente las membranas celulares pero, en general, reacciona cerca de su lugar de origen, de modo que los sitios en los cuales ejerce su acción nociva suelen ser muy específicos. Tiene gran capacidad de producir daño. Es la especie reactiva más potente y nociva. Ataca a diversos compuestos orgánicos a los cuales sustrae un electrón. Se forma H_2O y el sustrato se convierte en radical, iniciando así una reacción en cadena; se lo considera el principal iniciador de peroxidación lipídica (ver sección siguiente). La remoción de estos radicales es crítica para prevenir daño a los tejidos.

Radicales peróxido. Los radicales antes mencionados pueden reaccionar con diversas sustancias produciendo nuevos radicales. Por ejemplo, el ataque del radical hidroxilo a ácidos grasos poliinsaturados forma radicales lipídicos (representados abreviadamente con la notación L•) que inician una reacción en cadena. Por adición de O_2, se forman radicales lipoperoxilo (LOO•) y éstos generan nuevos radicales lipídicos:

1) $LH + {}^{\bullet}OH \rightarrow L^{\bullet} + H_2O$ (iniciación)
2) $L^{\bullet} + O_2 \rightarrow LOO^{\bullet}$ (propagación)
3) $LOO^{\bullet} + L'H \rightarrow LOOH + L'^{\bullet}$

El proceso en cadena se detiene si dos radicales reaccionan entre sí, lo que ocurre menos frecuentemente que la formación de nuevos radicales, de modo que éstos continúan produciéndose si no son eliminados por los sistemas disponibles en el organismo.

Especies reactivas de nitrógeno

Entre éstas se cuentan los radicales óxido nítrico (NO•) y dióxido de nitrógeno ($NO_2^{\bullet}$) y los no radicales ácido nitroso (HNO_2) y peroxinitrito (ONO_2^-).

Óxido nítrico. El óxido nítrico es un radical libre de gran reactividad química, razón por la cual tiene una vida media efímera (menos de 5 segundos). Difunde fácilmente a través de membranas celulares.

Es generado a partir de arginina en reacción catalizada por la *óxido nítrico sintasa* (NOS) con la participación de las coenzimas NADPH, FMN, FAD y tetrahidrobiopterina. La enzima contiene Fe^{2+} hemínico y es activada por el complejo Ca^{2+}-calmodulina. Como productos de la reacción se forman citrulina y óxido nítrico (ver pág. 350).

En mamíferos se han reconocido tres isozimas de óxido nítrico sintasa, con distribución celular y propiedades regulatorias diferentes. Una se encuentra en células endoteliales de vasos sanguíneos (NOS *e* o I), otra en macrófagos (NOS *i* o II) y una tercera en neuronas (NOS *n* o III). Esta nomenclatura refiere al sitio de localización predominante de las distintas isoenzymas, pero las distintas NOS también se pueden encontrar en muchos otros tejidos. Las isozimas I y III son constitutivas. La enzima de macrófagos (II) es inducible.

El óxido nítrico es el *factor de relajación vascular derivado de endotelio* descrito antes de conocerse su naturaleza química. Participa como mensajero de un sistema de señales, uno de cuyos eslabones es la guanilato ciclasa. Produce vasodilatación en diversos territorios vasculares. Puede influir sobre distintas moléculas comprometidas en sistemas de transmisión de señales.

Hay evidencias de que el óxido nítrico participa como neurotransmisor en importantes funciones del sistema nervioso.

En macrófagos y otras células fagocíticas la óxido nítrico sintasa es inducida por factores liberados en focos inflamatorios ante la entrada de agentes extraños. La brusca liberación de óxido nítrico genera radicales libres con acción tóxica sobre bacterias, células tumorales y otros materiales fagocitados.

Durante la explosión respiratoria en estas células se producen óxido nítrico y radical superóxido que pueden reaccionar entre sí y producir una molécula oxidante muy activa, el ácido peroxinitroso (peroxinitrito a pH neutro):

$$NO^{\bullet} + {}^{\bullet}O_2^- \rightarrow ONOO^-$$

El peroxinitrito ataca a restos cisteína y metionina en proteínas. También reacciona con residuos tirosina, agregando NO_2 al anillo bencénico. La modificación de proteínas en condiciones de estrés oxidativo puede afectar sistemas de transmisión de señales; este es un tema de creciente interés.

Efectos nocivos de las especies reactivas

Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno causan daños en diferentes moléculas componentes de las células como ADN, proteínas, lípidos y carbohidratos.

ADN. Se producen modificaciones químicas de las bases púricas y pirimídicas. Por ejemplo, el ataque de radicales hidroxilo genera derivados como 8-OH-guanina, glicol-timina o 5-OH-uracilo. La cantidad de este tipo de compuestos eliminada por orina da idea de la magnitud del daño. También puede ser atacada la hebra del ADN formada por la sucesión de desoxirribosas fosfato, con producción de rupturas.

Algunas de estas modificaciones son mutagénicas. La acumulación de mutaciones más allá de la capacidad de reparación de las células puede llevar a transformación maligna (cáncer).

Proteínas. Oxidan grupos sulfhidrilos de proteínas (se forman enlaces –S–S– o derivados S-nitrosilados) con alteración de la estructura de la molécula. Otros restos aminoacídicos, como arginina, metionina, histidina y prolina, son susceptibles de modificaciones por radicales hidroxilo. Las alteraciones producidas en proteínas por el daño oxidativo incluyen desde cambios conformacionales hasta rupturas de la cadena polipeptídica. En el caso de enzimas, es posible que disminuya o se anule su actividad.

Lípidos. Los ácidos grasos insaturados de lípidos componentes de membranas celulares son particularmente sensibles a las especies reactivas. También son afectadas lipoproteínas del plasma sanguíneo.

Se forman peróxidos que determinan, además de cambios conformacionales, disminución de la hidrofobicidad de las cadenas hidrocarbonadas con desestabilización de la membrana. Los eritrocitos, por ejemplo, se hemolizan fácilmente.

La peroxidación de las cadenas de ácidos grasos insaturados con 3 o más dobles ligaduras produce ruptura del ácido graso original con formación de diversos compuestos. Uno de ellos es el malondialdehído (fig. 10-1).

La determinación de la concentración de malondialdehído en sangre y orina ofrece un índice del daño causado por las especies reactivas de oxígeno.

Carbohidratos. Radicales hidroxilo pueden reaccionar con hidratos de carbono sustrayendo hidrógeno y generando radicales al azar. Se forman peroxilos y suelen producirse rupturas de las cadenas de polisacáridos; por ejemplo, de las de ácido hialurónico.

Patología relacionada. *Cáncer*. El daño causado por radicales libres en bases y estructura del ADN y las alteraciones en proteínas regulatorias de la actividad genética son factores importantes en la iniciación y promoción de transformación maligna en las células.

Aterosclerosis. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) penetran en la íntima a través de poros del endotelio vascular y se unen a proteoglicanos de la matriz extracelular. Mientras mayor la cantidad de LDL circulante, mayor su acúmulo en el vaso. La permanencia prolongada de lipoproteínas próximas al endotelio las hace pasibles de modificaciones, por ejemplo oxidación promovida por peróxido de hidrógeno, radicales peróxido e hidroxilo. Los agentes oxidantes estimulan la expresión de factores que atraen leucocitos a la zona afectada e inician una reacción inflamatoria. Los monocitos llegados al sitio de acumulación de LDL oxidadas se convierten en macrófagos y fijan esas LDL con sus receptores "recolectores de residuos" (*scavenger receptors*). Las LDL son internadas y almacenadas en los macrófagos; su citoplasma se llena de gotitas oleosas que dan a las células un aspecto al cual deben su nombre de *células espumosas*. Las agrupaciones de células espumosas son visibles como "estrías grasas". La liberación de citoquinas y factores de crecimiento en el sitio de inflamación promueve la proliferación de células del músculo liso y síntesis de colágeno y elastina, responsables de fibrosis y rigidez vascular. Las células espumosas mueren y liberan ésteres de colesterol que forman la masa oleosa iniciadora de la placa de ateroma. Todas las evidencias señalan a la oxidación de LDL por especies reactivas como un factor muy importante en la aterogénesis.

Síndrome de reperfusión. En infartos de miocardio, accidentes cerebrovasculares y otras condiciones que determinan insuficiente aporte sanguíneo en un territorio vascular (isquemia) se generan especies reactivas de oxígeno, especialmente H_2O_2. Esto se explica por: a) La liberación *in situ* de compuestos que atraen y activan neutrófilos, con subsiguiente producción de H_2O_2 y superóxido. b) Las perturbaciones en la cadena

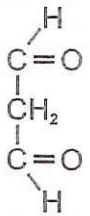


Fig. 10-1. Malondialdehído.

respiratoria permiten el escape de electrones para dar superóxido. c) La interrupción de la producción de ATP deja un exceso de ADP que es catabolizado a hipoxantina, xantina y ácido úrico. Durante estas reacciones, catalizadas por la *xantina oxidasa*, se produce H_2O_2.

En el tratamiento de la isquemia se administra oxígeno y, si se restablece la provisión de sangre, la *reperfusión* puede agravar el daño, ya que la xantina oxidasa sigue acumulando peróxido de hidrógeno.

Artritis reumática. La generación de especies reactivas en el líquido sinovial es causa de daño en los procesos inflamatorios de articulaciones.

Cataratas. Las proteínas del cristalino tienen numerosos restos cisteína y metionina, ambos muy sensibles a la oxidación. La luz también contribuye al estrés oxidativo. Las alteraciones de la estructura proteica son responsables de la pérdida de transparencia.

Pulmón y cerebro son particularmente sensibles a los agentes oxidantes. Respirar concentraciones elevadas de oxígeno durante un tiempo prolongado favorece la formación de especies reactivas de oxígeno y puede causar alteraciones graves en sistema nervioso y pulmón.

Las especies reactivas también han sido implicadas como factores importantes en el proceso de envejecimiento. La acumulación de daños causados por radicales libres en membranas, proteínas y ADN contribuyen al envejecimiento celular.

Grupos de riesgo. Las posibilidades de sufrir daños oxidativos son mayores en ciertos grupos humanos. En primer lugar los *recién nacidos prematuros*, porque tienen un sistema antioxidante inmaduro, inadecuado para enfrentar el desafío que representan tensiones altas de oxígeno en las incubadoras o las radiaciones lumínicas utilizadas para el tratamiento de hiperbilirrubinemias.

Los *fumadores* están expuestos a radicales libres y tienen mayor riesgo de padecer enfermedades favorecidas por las especies reactivas. Se ha comprobado que los fumadores tienen un nivel de daño en el ADN mitocondrial de pulmón seis veces mayor que los no fumadores. La exposición activa o pasiva al humo de tabaco reduce la actividad de la cadena respiratoria y disminuye la generación de energía. Por otro lado, el monóxido de carbono que contiene inhibe la citocromo c oxidasa.

Los *alcoholistas* desarrollan una capacidad metabólica aumentada para manejar la sobrecarga de etanol y ello condiciona una mayor generación de especies reactivas.

Personas que trabajan habitualmente en ambientes donde hay solventes volátiles u otros contaminantes del ambiente, por ejemplo, conductores expuestos durante muchas horas diarias a altos niveles de gases de escape en zonas de tránsito muy denso. Otra condición que favorece la producción de especies reactivas es la exposición a radiaciones ionizantes.

Se han descrito daños oxidativos en gran número de enfermedades: diabetes, enfisema, fallas renales agudas, síndrome de Down, enfermedad de Parkinson.

Si bien las reacciones del tipo mencionado resultan frecuentemente en daños, en algunos casos pueden ser beneficiosas. No todas son acciones indeseables; la producción controlada, en bajas concentraciones, de especies reactivas puede ser importante para el funcionamiento celular. Se sabe que es crítica en sistemas de transmisión de señales ("señalización redox"). Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno de molécula pequeña, generadas por NADPH oxidasas y óxido nítrico sintasa, activan vías de señales que controlan la diferenciación celular y la apoptosis. Las mitocondrias serían el sitio donde se coordina el señalamiento redox mediado por productos de oxidación de lípidos.

La producción de superóxido y de derivados lipídicos oxidados es responsable de modificaciones postraducción, no siempre perjudiciales, de proteínas integrantes de sistemas de señales. Algunos de esos derivados, o productos de degradación de lípidos complejos, como la lisofosfatidilcolina, actúan como moléculas señalizadoras.

MECANISMOS DE DEFENSA CONTRA LAS ESPECIES REACTIVAS

Para contrarrestar la toxicidad de las especies reactivas, el organismo dispone de mecanismos eficaces de protección. En condiciones normales, a las tensiones de O_2 del aire atmosférico, las concentraciones de esos agentes tóxicos se mantienen en niveles muy bajos. Esto se debe a la acción conjunta de sistemas antioxidantes endógenos y de compuestos exógenos aportados por los alimentos.

Sistemas endógenos. *Superóxido dismutasa* (SOD). Los aniones superóxido son eliminados en una reacción catalizada por una enzima extraordinariamente activa, distribuida en todos los tejidos, la *superóxido dismutasa*. En la reacción participan dos aniones superóxido y dos protones:

$$^{\bullet}O_2^- + {}^{\bullet}O_2^- + 2\,H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

La cesión de un electrón de un anión superóxido a otro corresponde a las llamadas reaccio-

nes de dismutación. Se forma peróxido de hidrógeno, que también es un producto tóxico y debe ser eliminado.

La superóxido dismutasa presenta dos isozimas; una de ellas contiene Zn y Cu y se encuentra en el citosol; la otra tiene Mn y se localiza en mitocondrias.

El Zn, el Cu y el Mn, como integrantes esenciales de la SOD, están comprometidos en la protección contra el estrés oxidativo.

Catalasa. La descomposición del peróxido de hidrógeno es catalizada por la *catalasa*, hemoproteína de gran actividad existente en casi todas las células, en especial en hígado, riñón, médula ósea y glóbulos rojos. Los fagocitos son muy ricos en la enzima.

La catalasa forma, a partir de dos moléculas de peróxido de hidrógeno, dos de agua y una de oxígeno:

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

La enzima se encuentra predominantemente en peroxisomas, pequeñas organelas que contienen oxidasas productoras de peróxido de hidrógeno. Aunque en niveles muy bajos, también hay catalasa en citosol, mitocondrias y microsomas.

Se han descrito casos de personas con escasa o nula actividad catalásica en sus tejidos; se trata de un defecto genético llamado *acatalasemia*. Curiosamente, esta deficiencia no produce trastornos importantes. Es probable que otras enzimas compensen la falta de catalasa.

Glutatión peroxidasa (GPx). Esta enzima contiene selenio; cataliza la reducción de hidroperóxidos orgánicos (ROOH) y de peróxido de hidrógeno en reacciones en las que el glutatión (GSH) participa como donante de hidrógeno.

$$ROOH + 2\ GSH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$$
$$H_2O_2 + 2\ GSH \rightarrow GSSG + 2\ H_2O$$

En estas reacciones cada glutatión cede un electrón de su grupo –SH, que queda convertido en radical tiílo (–S˙). Dos de estos radicales forman glutatión oxidado (GSSG), con un puente disulfuro.

Debido al papel del selenio en la glutatión peroxidasa, este micronutriente mineral es considerado un agente antioxidante.

La glutatión peroxidasa está localizada en citosol y mitocondrias. Ayuda a mantener baja la concentración de peróxido de hidrógeno en los tejidos; convierte ácidos grasos peroxidados en derivados hidroxilados y también puede revertir la oxidación de grupos sulfhidrilos en proteínas y otros compuestos.

El glutatión oxidado es reducido por acción de *glutatión reductasa*, enzima dependiente de NADPH:

$$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2\ GSH + NADP^+$$

Existen otras peroxidasas que contribuyen a la eliminación de peróxido de hidrógeno. Son hemoproteínas muy comunes en vegetales, también presentes en leucocitos y en la leche. Catalizan la reacción:

$$H_2O_2 + AH_2 \rightarrow 2\ H_2O + A$$

Donde AH_2 representa distintos sustratos donantes de hidrógeno utilizados por las peroxidasas. La enzima de granulocitos neutrófilos emplea NADPH como donante de hidrógeno.

Otras moléculas sintetizadas en el organismo que poseen grupos tiol y pueden actuar como dadores/receptores de electrones son la tiorredoxina y el ácido lipoico.

Coenzima Q. También designada Q_{10} o *ubiquinol*, actúa como reductor eliminando radicales libres, incluido el hidroxilo. La forma reducida de CoQ ($CoQH_2$) es liposoluble y se la encuentra en la membrana interna de mitocondrias como componente de la cadena respiratoria y, además, en lipoproteínas, a las cuales protege de la oxidación, interrumpiendo la formación de radicales peroxilo. En el proceso, la $CoQH_2$ se convierte en semiquinona ($CoQH^\cdot$).

La síntesis de estos agentes antioxidantes es inducida por el factor nuclear eritroide (Nfe) y factores nucleares relacionados (Nrf1, Nrf2, Nrf3), factores de transcripción en el citosol que, cuando son activados por compuestos oxidantes, pasan al núcleo donde se unen a sitios específicos del ADN y promueven la producción de componentes del sistema de defensa.

Ácido dihidrolipoico. Es la forma reducida del ácido lipoico; funciona como potente agente reductor, tanto en medios acuosos como lipídicos.

Metalotioneína. Es una proteína rica en restos cisteína y metionina que actuaría en la neutralización de radicales hidroxilo.

El *ácido úrico* y la *bilirrubina* del plasma también tienen propiedades antioxidantes.

Nutrientes con propiedades antioxidantes. Las vitaminas E y C son los principales. La mayor diferencia entre ambas está dada por sus características de solubilidad. La vitamina C o ácido ascórbico es hidrosoluble y se encuentra en los medios acuosos intracelulares y extracelulares, mientras la vitamina E, altamente lipofílica, se localiza en membranas y lipoproteínas.

Los carotenoides son otro grupo de micronutrientes que actúan como protectores del ataque de especies reactivas de oxígeno.

Vitamina C o ácido ascórbico (ver pág. 605). La vitamina C participa en la defensa contra iones superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y oxígeno singulete. También neutraliza especies reactivas de nitrógeno.

El ácido ascórbico ($AscH_2$), disuelto en la sangre y el citosol, actúa rápidamente antes que se produzcan daños. El radical hidroxilo es reducido por ascorbato con producción de agua y radical ascorbilo ($AscH^{\bullet}$), que es relativamente estable, poco activo.

$$AscH_2 + {}^{\bullet}OH \rightarrow H_2O + AscH^{\bullet}$$

Con el anión superóxido forma peróxido de hidrógeno. Inicialmente el ascorbato ($AscH_2$) se convierte en radical ascorbilo.

La vitamina C reacciona también con peróxido de hidrógeno para producir agua y ácido deshidroascórbico (Asc):

$$AscH_2 + H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + Asc$$

Dos ascorbilos pueden reaccionar entre sí para formar una molécula de ácido ascórbico y otra de deshidroascórbico.

Vitamina E (ver pág. 583). Habitualmente se localiza en membranas celulares con la cadena fitilo insertada en la doble capa y el grupo cromanol próximo a la superficie. Cede el hidrógeno del grupo OH del anillo cromano e interrumpe las reacciones en cadena de radicales lipídicos y lipoperoxilos. Es importante como protector de lipoproteínas.

$$L^{\bullet} + VitE.OH \rightarrow LH + VitE.O^{\bullet}$$
$$LOO^{\bullet} + VitE.OH \rightarrow LOOH + VitE.O^{\bullet}$$

Se forma radical tocoferilo ($VitE.O^{\bullet}$), una semiquinona relativamente poco reactiva, ya que es estabilizada por resonancia. El tocoferilo deja de ser antioxidante y debe ser reciclado a su estado inicial para mantener la capacidad de neutralizar peroxilos en la membrana.

De los ocho vitámeros de vitamina E, el α-tocoferol es el más importante.

Carotenoides (ver pág. 575). Son efectivos en la eliminación de oxígeno singulete y radicales peroxilo. En el caso del oxígeno singulete, los carotenoides, tanto en membranas como en solución, absorben la energía extra y se forma oxígeno triplete o basal. La capacidad de los carotenoides para neutralizar oxígeno singulete está relacionada con las dobles ligaduras conjugadas de su cadena lateral. Los carotenoides "cargados" liberan la energía al medio en forma de calor y no necesitan reacción adicional para ser regenerados.

El *licopeno* (fig. 10-2) es un carotenoide abundante en tomates, que tiene importante acción antioxidante.

Flavonoides. Son polifenoles contenidos en diversos componentes de la dieta. Tienen una potente acción antioxidante *in vitro*, pero aún no hay una demostración irrefutable de que ejerzan la misma acción *in vivo* en humanos.

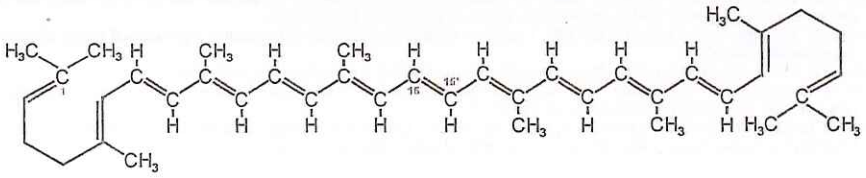
Regeneración de antioxidantes. Como resultado de las reacciones con especies reactivas, los agentes antioxidantes dan productos oxidados y radicales que, aunque son poco activos, deben ser permanentemente reconvertidos a su estado original a fin de mantener el sistema de defensa.

El ácido ascórbico es reciclado de ascorbilo o deshidroascórbico por transferencia de hidrógeno desde glutatión reducido (GSH) y NADPH.

Para el caso de la vitamina E, se ha calculado que en las membranas celulares hay 9 moléculas por cada 2.000 de ácidos grasos insaturados, de modo que la regeneración debe ser muy activa e inmediata para conservar su capacidad antioxidante.

El ascorbato es una de las moléculas que, aproximándose a la superficie de las membranas, reconvierten el radical tocoferilo (semiquinona) a su forma original:

$$VitEO^{\bullet} + AscH_2 \rightarrow VitEOH + AscH^{\bullet}$$



Todo-*trans*

Fig. 10-2. Licopeno.

La semiquinona también puede ser revertida a vitamina E en reacciones con ácido dihidrolipoico, o con las formas reducidas de tiorredoxina, glutatión y CoQ.

Suplementación de micronutrientes antioxidantes. Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno se producen constantemente como productos del metabolismo. Son potencialmente nocivas, pero una persona sana, con una alimentación adecuada, dispone de mecanismos idóneos para minimizar el daño posible y, si éste ocurriese, para repararlo.

En casos en los cuales aumenta la generación de radicales libres, ya sea por infecciones, traumas físicos, exposición a diversos agentes oxidantes u otras causas que superen la capacidad del organismo para neutralizarlos, pueden ocurrir cambios irreversibles y crearse condiciones para transformaciones malignas de células (cáncer) o procesos patológicos crónicos (aterosclerosis y otros).

En vista de las propiedades demostradas por los micronutrientes con capacidad antioxidante, se pensó que la administración de suplementos a la dieta podría tener efectos preventivos de los daños y enfermedades producidas por especies reactivas.

Se han realizado numerosos estudios en gran número de personas a quienes se suministraron micronutrientes antioxidantes, solos o combinados, durante un tiempo prolongado. En estos grupos se analizó la incidencia de las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

Hasta ahora los resultados no son concluyentes; muchas de las investigaciones que dan efectos favorables han sido motivo de reevaluación por otros autores, que encontraron deficiencias en el diseño experimental. Algunos estudios rigurosamente controlados no mostraron acción positiva alguna.

La conveniencia de administrar dosis extra de antioxidantes no está aún suficientemente probada; se requieren más datos e investigaciones.

Lo que está bien establecido es que los individuos con un buen aporte dietario de vegetales presentan menor riesgo de enfermedades crónicas que los que no lo tienen. Parece incuestionable que una dieta rica en verduras y frutas frescas, es parte esencial de una buena alimentación y aporta los factores antioxidantes requeridos para mantener el estado de salud.

RESUMEN

En el metabolismo normal se producen y desde el ambiente llegan agentes oxidantes que pueden causar daños en órganos y tejidos. Esos factores nocivos, causantes del llamado estrés oxidativo, comprenden especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. Las primeras están representadas por oxígeno singulete, peróxido de hidrógeno, anión superóxido y radical hidroxilo, los dos últimos radicales libres. Las especies reactivas de nitrógeno son el óxido nítrico (radical libre) y peroxinitrito.

Estos oxidantes dañan particularmente ADN, proteínas y lípidos y favorecen el desarrollo de transformación maligna de células, aterosclerosis, artritis reumatoidea y cataratas; son también responsables del síndrome de reperfusión.

Los mecanismos de defensa contra estos agentes oxidantes comprenden factores endógenos, principalmente enzimas como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, coenzima Q, ácido dihidrolipoico, metalotioneína, y factores exógenos, aportados por los alimentos, como ácido ascórbico, vitamina E, carotenoides y flavonoides.

BIBLIOGRAFÍA

Bánhegyi G., Benedetti A., Csala M., Mandl J. (2007). Stress and redox. *FEBS Letters*, 581: 3634-3640.

Bonomini F., Tengattini S., Fabiano A., Bianchi R., Rezzani R. (2008). Atherosclerosis and oxidative stress. *Histology and Histopathology*, 23: 381-390.

Dröge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82: 47-95.

Galkin A., Higgs A., Moncada S. (2007). Nitric oxide and hypoxia. *Essays in Biochemistry*, 43: 29-42.

Gropper S.S., Smith J.L., Grote J.L. (eds.). (2005). The antioxidant nutrients, reactive species, and disease. En: *Advanced Nutrition and Human Metabolism*, 4th edition, pp. 368-377. Thomson Wadsworth, Belmont, CA.

Gutiérrez J., Ballinger S.W., Darley-Usmar V.M., Landar A. (2006). Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids. *Circulation Research*, 99: 924-932.

Halliwell B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35: 1147-1150.

Navah M., Ananthramaiah G.M., Reddy S.T. et al. (2004). The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *Journal of Lipid Research*, 45: 993-1007.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J. Cronin M.T., Mazur M., Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39: 44-84.

CAPÍTULO 11

Membranas

La superficie externa de las células está revestida por la *membrana plasmática,* una película muy fina (espesor entre 6 y 10 nm), constituida por lípidos, proteínas y carbohidratos. No es ésta una simple envoltura inerte, sino una estructura con notables propiedades funcionales: a) Constituye una verdadera "barrera con permeabilidad selectiva", que controla el pasaje de solutos y agua a su través e impide la mezcla al azar de los componentes del medio intracelular con los de su entorno. Sistemas de transporte en la membrana son en gran medida responsables de mantener la constancia del medio intracelular y crear las diferencias en concentración de distintas moléculas e iones existentes entre el citosol y el exterior celular. b) Provee el ambiente adecuado a numerosas enzimas insertas en ella. c) Posee receptores a los cuales se unen hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores y otros "mensajeros" químicos que activan sistemas de señales, parte de cuyos componentes se encuentran en la misma membrana plasmática. Esto desencadena una serie de respuestas específicas en cada tipo celular. d) Participa activamente en procesos de incorporación a la célula, o secreción al exterior, de macromoléculas y partículas (endocitosis y exocitosis). e) Su superficie externa posee constituyentes que actúan como "señales de reconocimiento" indispensables para la adhesión a otras células o estructuras, condicionando el "comportamiento social" de las células. f) La membrana juega un papel estructural, contribuye a mantener la forma de la célula.

Las organelas intracelulares también están rodeadas por membranas cuya organización básica es similar a la de membrana plasmática. Gracias a ellas, las formaciones subcelulares mantienen su individualidad e independencia funcional.

ESTRUCTURA

Todas las membranas biológicas están constituidas por lípidos y proteínas. La cantidad relativa de estos compuestos varía notablemente en células de distintos tejidos y en diferentes organelas de una misma célula. Por ejemplo, la membrana de glóbulos rojos contiene aproximadamente 50% de proteínas y 50% de lípidos; las membranas de las vainas de mielina, cuya función principal es aislar las fibras nerviosas, poseen 80% de lípidos y 20% de proteínas. La membrana interna de mitocondrias tiene 80% de proteínas. Los lípidos y proteínas frecuentemente se asocian a carbohidratos; es común encontrar glicolípidos y glicoproteínas en las membranas.

Lípidos

Los lípidos forman la estructura básica de todas las membranas biológicas. En ellas se encuentran: 1) *fosfolípidos* (glicerofosfolípidos y esfingomielina), 2) *glicolípidos* (cerebrósidos y gangliósidos) y 3) *colesterol.*

Los lípidos complejos como fosfo- y glicolípidos son anfipáticos, con una porción o "cabeza" polar y largas cadenas hidrocarbonadas o "colas" apolares. Este dualismo tiene gran importancia en la estructura de las membranas.

Formación de películas lipídicas. Cuando se coloca una pequeña cantidad de lípidos anfipáticos en la superficie de una solución acuosa, se forma una capa de una molécula de espesor (monocapa), en la cual las cabezas polares se orientan

hacia la solución, atraídas por el agua, mientras las cadenas hidrofóbicas se disponen perpendicularmente, alejándose de la superficie acuosa (fig. 2-9 A). Si en el seno de una solución acuosa se introducen lisofosfolípidos o sales de ácidos grasos (jabones), ambos anfifílicos, se forman pequeñas esferas llamadas *micelas* en las cuales las cabezas hidrofílicas de los lípidos se disponen hacia la superficie, en contacto con el medio, y las colas hidrófobas se orientan hacia el interior (fig. 2-9 B). Los fosfo- y glicolípidos inmersos en soluciones acuosas también adoptan otras disposiciones. Si se extienden en el orificio que comunica dos compartimientos de un recipiente lleno con soluciones acuosas, es posible lograr la formación de una lámina constituida por una doble capa de moléculas. En éstas, las cabezas polares de las moléculas en cada una de las capas se dirigen hacia la solución acuosa adyacente y entran en contacto con ella; las colas apolares se dirigen hacia el interior de la película, altamente hidrofóbico (fig.11-1 A).

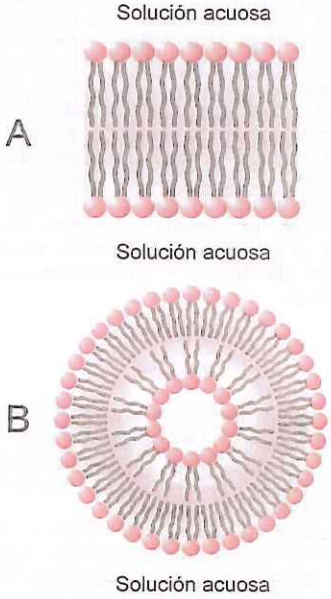


Fig. 11-1. A. Bicapa plana de fosfolípidos. Las cabezas polares de las moléculas (esferas rojas) se disponen en la superficie de contacto con la solución acuosa. Las cadenas hidrofóbicas, indicadas con líneas onduladas, se dirigen hacia el interior de la película. B. Sección transversal de un liposoma monolamelar, vesícula formada por una bicapa de fosfolípidos. Las cabezas polares se ubican en las superficies externa e interna de la vesícula, en contacto con la solución acuosa.

Liposomas. En una suspensión acuosa de un lípido anfipático, éste se dispone en bicapas cerradas sobre sí mismas. Estas vesículas o burbujas, designadas *liposomas,* pueden estar formadas por una sola película (liposoma monolamelar) (fig. 10-1 B) o por varias bicapas concéntricas, dispuestas como las láminas de una cebolla (multilamelar).

Los liposomas se han utilizado en el estudio de las propiedades fisicoquímicas de bicapas lipídicas, pues poseen un comportamiento semejante al de las membranas biológicas. Además, diferentes proteínas de transporte se han incorporado a liposomas para estudiar sus propiedades funcionales en un ambiente más controlado que el de la célula entera. Los liposomas tienen propiedades interesantes; cuando se preparan en una solución, al formarse las vesículas atrapan en su interior una pequeña porción de la solución. Estos liposomas "cargados" pueden fusionarse con membranas celulares y así servir de vehículo para incorporar en las células compuestos que normalmente no son captados con facilidad.

Constitución de membranas celulares. Como en los liposomas, las bicapas lipídicas de las membranas biológicas forman sacos cerrados que delimitan las células. La *membrana plasmática* presenta una cara citosólica que mira al interior, y una faz exoplásmica, hacia el espacio extracelular. En las membranas de organelas, la cara externa es la faz citosólica.

Entre los constituyentes de la bicapa o doble hojuela, los fosfolípidos son los componentes más abundantes; poseen dos largas cadenas hidrocarbonadas apolares de 10 a 24 carbonos (más frecuentemente de 16 a 18 carbonos), saturadas e insaturadas.

Los carbonos de las cadenas saturadas rotan libremente alrededor de los enlaces simples y ello les permite oscilar entre una disposición extendida, en zigzag (fig. 5-1 A), llamada *trans* o *anti,* y otra contorsionada o "quebrada" (*gauche*). La configuración extendida, perpendicular al plano de la membrana, es más frecuente porque es la de menor energía libre; las interacciones mutuas de estas cadenas paralelas (creadas por las fuerzas de van der Waals) proporciona estabilidad estructural al conjunto de fosfolípidos.

En los ácidos grasos insaturados, la presencia de dobles ligaduras en configuración *cis*, la más común en compuestos naturales, produce angulaciones rígidas, tiende a distanciar las colas hidrocarbonadas (fig. 5-1 B) y da una disposición más "abierta" al conjunto de cadenas hidrófobas.

El fosfolípido predominante en membranas es fosfatidilcolina; en menor proporción se encuentran fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, esfingomielina y fosfatidilinositol. La hidrólisis

de la unión éster del ácido graso en posición 2 de glicerofosfolípidos, catalizada por fosfolipasa A, frecuentemente deja en libertad araquidonato, precursor de eicosanoides.

Un derivado del fosfatidilinositol (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato) es integrante de un sistema de transducción de señales activado por hormonas; su hidrólisis da lugar a la formación de inositol-1,4,5-trisfosfato y diacilglicerol, que actúan como mensajeros (pág. 496).

Los glicolípidos, principalmente cerebrósidos y gangliósidos, constituyen una pequeña proporción de los componentes de la membrana. La porción glucídica de sus moléculas suele actuar como "señal de reconocimiento" celular.

El colesterol es cuantitativamente importante, principalmente en membrana plasmática. Tiene un hidroxilo en el carbono 3, mientras el resto de la molécula, con el núcleo esteroide y la cadena hidrocarbonada inserta en C17, son francamente hidrófobos. A diferencia de fosfo- y glicolípidos, el colesterol no forma por sí solo bicapas. Se inserta en la membrana con el grupo hidroxilo próximo a las cabezas polares de los lípidos anfipáticos, mientras el núcleo cíclico, plano y rígido, y la cadena lateral extendida se disponen entre las colas hidrófobas en el seno de la doble hojuela.

Los distintos componentes lipídicos se mantienen ordenados en la doble capa gracias a las interacciones con el medio acuoso por un lado y con las cadenas hidrófobas de los lípidos vecinos por el otro, pero sin establecer entre ellos enlaces covalentes.

La bicapa lipídica es asimétrica. Las dos hojuelas que forman las membranas celulares no son idénticas en su composición, por ello se habla de *asimetría* de la membrana. En general, fosfatidilcolina y esfingomielina predominan en la capa externa, mientras fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina son más abundantes en la capa interna (citosólica en la membrana plasmática).

La composición lipídica de las membranas presenta diferencias entre distintas células de un mismo individuo. Por ejemplo, la relación molar fosfolípidos:colesterol:glicolípidos es 1:0,8:0,1 para membrana de glóbulos rojos y 1:1,3:0,7 para la de mielina.

Aún mayores suelen ser las diferencias entre membrana plasmática y la de distintas organelas en una misma célula. Por ejemplo, membranas mitocondriales presentan *cardiolipina*, fosfolípido ausente en otras membranas; los glicolípidos son componentes casi exclusivos de la cara externa de la membrana plasmática; el colesterol es abundante en membrana plasmática y muy escaso en membrana interna de mitocondrias.

Las membranas son películas fluidas. A temperaturas fisiológicas, la doble capa lipídica se comporta como una estructura fluida. La fluidez es tanto mayor cuanto más elevada es la proporción de ácidos grasos insaturados en las moléculas de los lípidos complejos que componen la membrana. Las cadenas hidrocarbonadas de ácidos grasos saturados se disponen preferentemente extendidas, formando conjuntos compactos que confieren mayor rigidez a la membrana. Cuando la temperatura aumenta, mayor número de uniones C-C adoptan conformaciones no extendidas ("gauche") que alteran el empaquetamiento de las cadenas y aumentan la fluidez. La presencia de ácidos grasos insaturados perturba la aproximación de las cadenas a cualquier temperatura y hace más fluida la membrana. El colesterol tiene distintos efectos; a altas temperaturas interfiere el movimiento de las cadenas hidrocarbonadas, lo cual tiende a reducir la fluidez, mientras a bajas temperaturas su presencia disminuye la rigidez de las agrupaciones entre las cadenas.

La fluidez de la doble hojuela permite que sus componentes se desplacen lateralmente con cierta libertad y que roten sobre un eje perpendicular a la membrana. Además de esta posibilidad de moverse y migrar en el plano en el cual se encuentran, las moléculas de fosfolípidos eventualmente saltan de una capa a otra de la misma membrana, en un movimiento denominado *"flip-flop"*. Este cambio de plano es mucho más restringido que el desplazamiento dentro de la propia capa lipídica.

El "*flip-flop*" no ocurre espontáneamente; la porción hidrofílica de los fosfolípidos encuentra resistencia para atravesar la porción hidrofóbica de la doble hojuela. Por esta razón, el *flip-flop* es catalizado por enzimas que realizan el cambio de capa. Se llaman *flipasas* las enzimas que determinan el transporte de lípidos desde la cara externa de la membrana plasmática, o interna de las organelas, hacia la citosólica. Este transporte se realiza contra el gradiente de concentración y requiere energía, que es cedida por hidrólisis de ATP. Se denominan *flopasas* los transportadores de lípidos en sentido inverso al de las *flipasas*, es decir, desde la capa citosólica, hacia el lado opuesto de la membrana. También son dependientes de ATP. Otros transportadores, designados *scramblasas*, facilitan el salto de lípidos en cualquier dirección, siguiendo el gradiente, no necesitan ATP. Los nombres de estas enzimas son una adaptación de los vocablos asignados por autores angloparlantes, para los cuales no existen equivalentes en castellano.

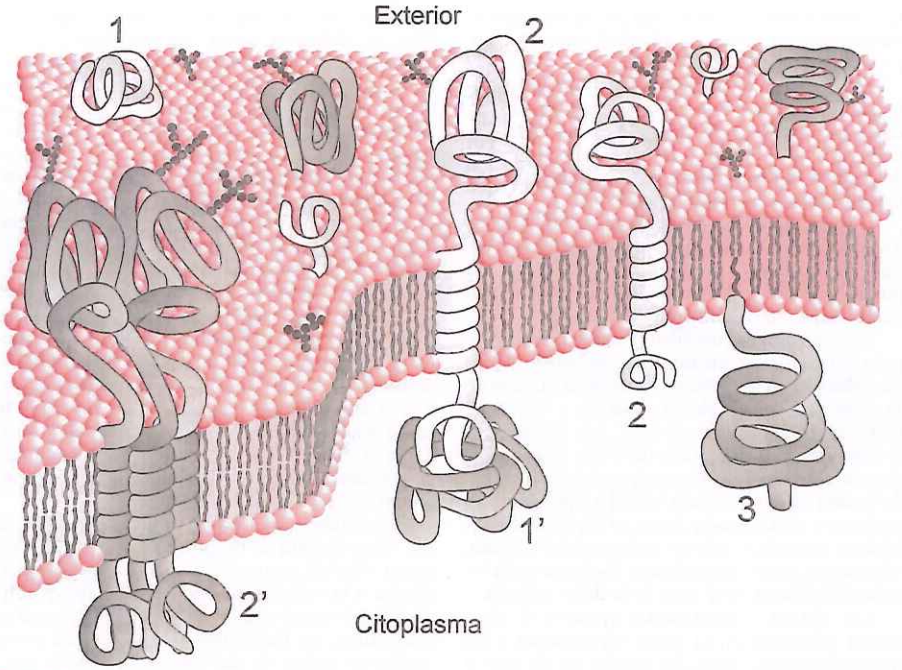


Fig. 11-2. Estructura de una membrana biológica (modelo del mosaico fluido). Se representa la lámina básica formada por la bicapa lipídica y proteínas y carbohidratos asociados. **1.** Proteína periférica yuxtapuesta sobre la cara externa. **1'.** Proteína periférica unida a la porción citosólica de una proteína transmembrana. **2.** Proteínas integrales insertas en la bicapa por una hélice α transmembrana. **2'.** Proteína integral con múltiples segmentos transmembrana. **3.** Proteína periférica anclada en la membrana por un lípido. Las cadenas de pequeños círculos negros representan oligosacáridos unidos a proteínas o a lípidos en la superficie externa.

Proteínas

En las membranas biológicas se encuentra una importante cantidad de proteínas, asociadas a los componentes de la bicapa lipídica por interacciones no covalentes. Según la naturaleza de esas interacciones, las proteínas de membrana se distinguen en *integrales* o intrínsecas y *periféricas* o extrínsecas.

Las *proteínas integrales* poseen porciones de su cadena insertas o "empotradas" en la doble capa. Algunas de ellas penetran hasta la parte media de la zona hidrofóbica de la membrana. La mayoría atraviesa la bicapa una o más veces (fig. 11-2). Sobre los dominios que afloran hacia la cara externa de la membrana plasmática frecuentemente se insertan oligosacáridos en unión covalente.

La cadena polipeptídica de proteínas integrales muestra características diferenciales en distintos sectores. En las zonas expuestas al medio acuoso predominan los restos aminoacídicos hidrófilos; en cambio, en las porciones que cruzan entre las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos, se encuentra mayor proporción de aminoácidos apolares. En general, estos dominios transmembrana adoptan la estructura en hélice α (fig. 11-3); comprenden unos 20 a 25 restos aminoacídicos, en su mayoría apolares, que presentan una superficie hidrófoba en las zonas de contacto con la zona lipídica. Algunas forman estructuras cilíndricas huecas por asociación de varias hélices α. Aunque la mayoría de los dominios transmembrana tienen estructura de hélice α, existen también otros constituidos por láminas β dispuestas en barril, rodeando un conducto central permeable. Muchas de estas estructuras con múltiples hélices α o láminas β forman un túnel abierto hacia ambas caras de la membrana, con su interior tapizado por grupos polares. Constituyen sitios de paso o transporte de sustancia a través de la membrana.

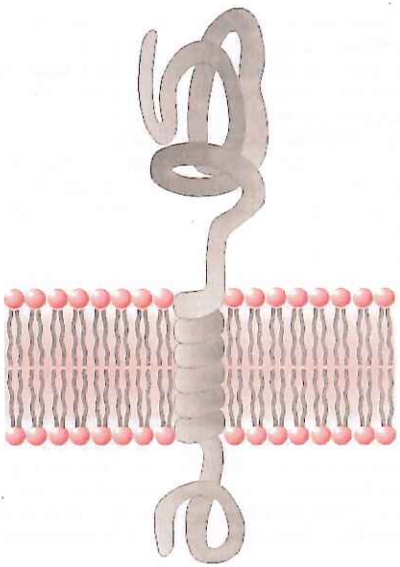


Fig. 11-3. Proteína integral de membrana con una hélice α transmembrana y dominios externo e interno.

En las proteínas integrales que atraviesan más de una vez el espesor de la bicapa, los trozos de cadena que conectan los segmentos transmembrana forman asas de distinta longitud que emergen a uno y otro lado de la membrana (fig. 11-2 y 11-3).

La extracción de proteínas integrales exige procedimientos drásticos, con empleo de detergentes o solventes especiales.

Las *proteínas periféricas* no alcanzan al centro hidrofóbico de la bicapa lipídica. Están simplemente yuxtapuestas sobre una de las caras de la membrana, unidas a ella por interacciones con los dominios polares de proteínas integrales o con las cabezas polares de los lípidos (fig. 11-2). Las cadenas laterales de restos aminoacídicos polares en la superficie de proteínas periféricas se asocian no covalentemente con grupos de la superficie de la membrana y con el agua del medio que las baña. Estas proteínas se pueden extraer fácilmente por tratamiento con soluciones salinas.

Algunas proteínas periféricas están asociadas a la membrana por estructuras de anclaje. Estas pueden ser un ácido graso, una cadena isoprenoide, o complejos como el glicosil-fosfatidil-inositol (fig. 11-4).

Los ácidos grasos utilizados para anclar proteínas a la membrana son el *mirístico*, de 14 C, y el *palmítico*, de 16 C. El ácido mirístico se une por enlace amídico a la función amina de glicina en el extremo N-terminal del polipéptido. El ácido palmítico, en cambio, se fija al S de un residuo cisteína generalmente cercano al C-terminal de la cadena polipeptídica. La cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos se inserta en la membrana, donde interacciona con el entorno hidrofóbico de la bicapa. Dos tipos de cadenas isoprenoides pueden servir para insertar proteínas en membranas celulares: *farnesilo*, de 15 carbonos, y *geranil-geranilo*, de 20. Estas cadenas se unen por enlace tioéster a una cisteína próxima al extremo C-terminal del polipéptido. Generalmente, las proteínas ancladas por ácidos grasos o cadenas isoprenoides se encuentran en el lado interno de la membrana plasmática; algunas de ellas tienen importantes funciones en sistemas de transmisión de señales.

Otro dispositivo de anclaje de proteínas es el *glicosil-fosfatidil-inositol* (GPI). Es una estructura oligomérica cuyo esqueleto básico está formado por fosfatidilinositol, glucosamina, manosas, galactosas y fosfatoetanolamina. Las dos cadenas hidrofóbicas de la porción fosfatidilinositol se introducen en la membrana y sirven de fijación a la misma. La fosfatoetanolamina en el otro extremo del GPI se une al

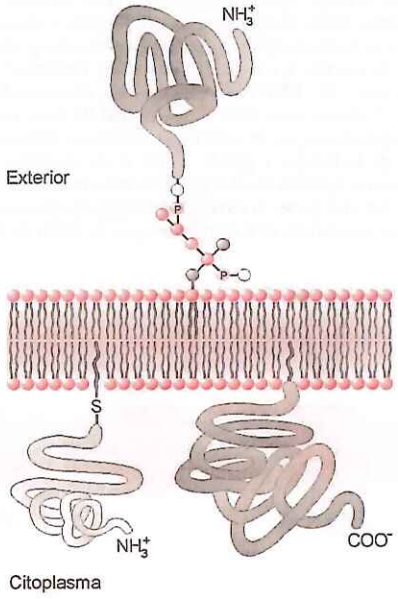


Fig. 11-4. Proteínas periféricas ancladas en la membrana por lípidos. Se representa una proteína fijada a la cara externa por glicosil-fosfatidil-inositol y dos unidas a la cara citosólica por cadenas lipídicas.

grupo carboxilo terminal del polipéptido. Estas estructuras fijan proteínas a la superficie externa de la membrana. Fosfatasa alcalina y acetilcolinesterasa, por ejemplo, están fijadas por GPI.

Desde el punto de vista de sus proteínas, las membranas biológicas son aún más asimétricas que con respecto a sus lípidos.

Las proteínas también pueden desplazarse lateralmente en la membrana, o rotar sobre su eje; se las ha comparado con "icebergs" que flotan en la bicapa lipídica. Esta concepción de la membrana como "mosaico fluido" fue propuesta en 1972 por Singer y Nicolson (fig. 11-2).

La capacidad de migrar dentro de su capa tornaría muy efímeras las interrelaciones de proteínas y lípidos en la membrana. Sin embargo, en la mayoría de casos, las relaciones tienen cierta estabilidad; las moléculas de lípidos que rodean una determinada proteína se mantienen asociadas a ella ("ánulo lipídico"), lo cual puede ser importante para asegurar la conformación adecuada. Es común que una proteína aislada presente propiedades diferentes de las que poseía integrada en la membrana y sólo recupere sus características nativas si se agregan al medio los lípidos correspondientes. Estas observaciones han llevado a revalorizar el entorno lipídico de las proteínas integrales. En la membrana existen "dominios lipídicos" o regiones de diferente composición relacionadas con distintas proteínas. La actividad de éstas está condicionada por la naturaleza de los constituyentes de la bicapa y puede variar si se modifica el dominio lipídico en el cual están inmersas.

Por otra parte, la movilidad de algunas proteínas en la membrana está restringida por la unión de filamentos del *citoesqueleto*, que en algunos casos las mantienen en una posición determinada. Por ejemplo, proteínas integrales de membrana de eritrocitos, como *glicoforina* y *banda 3* (transportador de aniones), están inmovilizadas por su asociación con proteínas periféricas y del citoesqueleto (*anquirina*, *actina*, *espectrina*). Estas forman una compleja malla que contribuye a mantener la forma del glóbulo rojo.

En algunas células (por ejemplo las que recubren los epitelios de túbulos renales y mucosa intestinal) la membrana muestra dos zonas estructural y funcionalmente diferenciadas. Se dice que la célula está *polarizada*. El polo situado hacia el lumen está cubierto por la membrana *apical* y el resto, en contacto con el espacio intersticial, es delimitado por la membrana *basolateral*. En cada una de éstas existen proteínas diferentes que difunden libremente dentro de su zona, pero no pueden cruzar a la otra debido a la existencia de las llamadas *uniones oclusivas* o *estrechas* (en inglés, *tight junctions*). Estas estructuras sellan el espacio entre células adyacentes y sirven de barrera al movimiento de lípidos y proteínas de la membrana.

Inserción de proteínas en membranas

Las proteínas recién sintetizadas en ribosomas unidos al retículo endoplásmico (RE) rugoso se introducen en él a través del canal o sistema de translocación en la membrana del RE y son liberadas en el lumen o insertadas en la membrana (pág. 481). Las proteínas componentes de membrana poseen señales especiales que les permiten fijarse en ella. La disposición final es

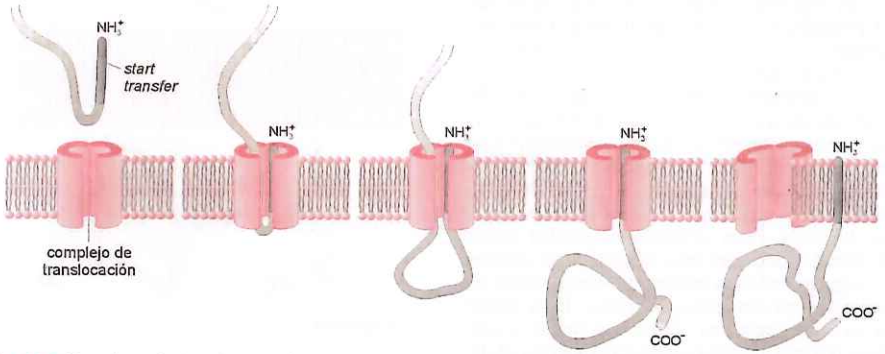


Fig. 11-5. Transferencia de cadenas polipeptídicas a través de la membrana del retículo endoplásmico (RE). La cadena posee una señal de comienzo o *start transfer* (segmento en negro) que se fija en el interior del canal de translocación mientras el resto de la proteína es transferido a la luz del RE. Completado el pasaje, el canal de translocación se abre y deja la proteína inserta en la membrana. Posteriormente el segmento señal es seccionado por una peptidasa y la proteína queda libre en el lumen.

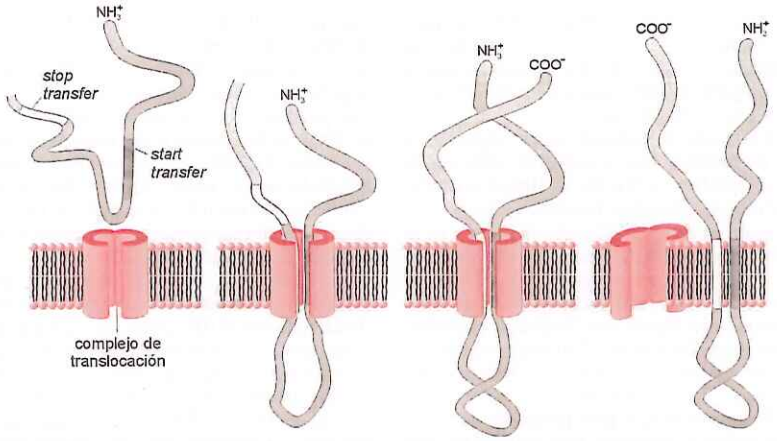


Fig. 11-6. Inserción de una proteína integral con dos segmentos transmembrana. La cadena polipeptídica tiene señales internas de comienzo (*start*, en negro) y detención (*stop*, en blanco). Primero se inserta en el canal de translocación un asa con la señal de comienzo; la cadena es impulsada a través del canal hasta llegar a la señal de detención, que queda retenida. La existencia de múltiples señales de comienzo y detención alternadas a lo largo de la cadena hace que ésta atraviese repetidas veces la doble capa. A uno y otro lado de la membrana emergen asas o bucles. Los cabos terminales pueden quedar en la misma cara o en lados opuestos.

determinada por la presencia de estos segmentos señalizadores. Algunos mecanismos de inserción se esquematizan en las figuras 11-5 y 11-6.

En el terminal N, o próximo a él, existe un trozo de 25 a 30 aminoácidos predominantemente hidrofóbicos que sirve de señal por la cual la cadena polipeptídica se fija en el interior del *canal* o *complejo proteico de translocación*. Los segmentos de *comienzo de transferencia* (*start transfer* en la literatura inglesa) promueven el pasaje de la cadena a través del canal. Puede suceder que todo el resto de la molécula pase al otro lado de la membrana y quede unido a ella por el segmento señalizador (fig. 11-5). Este segmento es seccionado por acción de una *peptidasa de la señal* dentro del RE y la proteína queda libre en el lumen. Otras proteínas poseen además segmentos hidrófobos de unos 25 aminoácidos en regiones internas de la cadena que se fijan al canal y detienen el pasaje (*secuencias de detención* o *stop transfer*). Este trozo de la cadena polipeptídica es retenido en la doble capa lipídica; en algunas proteínas el dominio del extremo N-terminal queda inmerso en el citosol y el C-terminal en el interior del RE y en otras ocurre lo contrario. En estos casos la proteína integral resultante tiene un solo segmento en hélice α transmembrana (fig. 11-3).

Frecuentemente la proteína atraviesa repetidas veces la bicapa y presenta múltiples segmentos transmembrana. Ello es determinado por la presencia de señales *start transfer* y *stop transfer* alternadas a lo largo de la cadena. Al final, la proteína se presenta plegada en bucles que emergen en ambas caras de la membrana (figs. 11-2 y 11-8). Los extremos de la cadena pueden quedar en lados opuestos o del mismo lado. Alcanzada la posición correcta, el canal del complejo de translocación se abre lateralmente y la proteína queda fijada en la bicapa.

Gran parte de las proteínas integrales insertas en la membrana del RE son exportadas a otras organelas o a la membrana plasmática. Para ello, porciones de membrana que contienen las proteínas se desprenden del RE en forma de vesículas y se dirigen a su destino por un mecanismo descripto más adelante (pág. 223). La disposición final de las proteínas en la membrana es asimétrica en la mayoría de los casos. La asimetría y la orientación se mantienen en el nuevo sitio de implantación (todas las porciones de la proteína que miran hacia el citosol en la membrana del RE seguirán dirigidas hacia el citosol tanto en la organela de destino como en la membrana plasmática).

Carbohidratos

La membrana plasmática contiene glúcidos unidos covalentemente a lípidos (cerebrósidos y gangliósidos) o a proteínas (glicoproteínas). Los carbohidratos se encuentran en la cara externa de la membrana formando el llamado *glicocáliz*.

Los glúcidos unidos a lípidos o proteínas pueden ser monosacáridos (glucosa o galactosa en cerebrósidos) u oligosacáridos de cadena más o menos compleja y frecuentemente ramificada (en gangliósidos y glicoproteínas).

Estos hidratos de carbono tienen importancia para el reconocimiento intercelular (interacciones célula-célula) o la fijación de ligandos (moléculas mensajeras, toxinas, bacterias, virus).

Un ejemplo de interacciones celulares es la adhesión de leucocitos al endotelio de vasos capilares, etapa previa a la migración de células fagocíticas desde la sangre hacia los sitios de reacción inflamatoria. Existe una familia de proteínas integrales transmembrana, llamadas *selectinas*, capaces de reconocer y unirse a oligosacáridos específicos en la superficie de leucocitos.

Las *lectinas* son proteínas presentes en vegetales, bacterias y animales, con capacidad para reconocer y fijar selectivamente determinados glúcidos de la superficie celular; han sido muy utilizadas en investigaciones sobre composición glucídica de superficies celulares.

Organelas subcelulares

Las células cuentan con membranas internas que delimitan compartimientos y organelas subcelulares. Si bien la estructura básica en bicapa lipídica es la misma para todas, hay diferencias notables en composición tanto en lípidos como en proteínas. La membrana de cada tipo celular y de cada organela desempeña funciones específicas y por lo tanto contiene las moléculas correspondientes a sus requerimientos. Los glóbulos rojos maduros no tienen organelas; por lo tanto, no poseen membranas internas.

Los principales compartimientos en las células animales son:

1. **Núcleo.** Está separado del citoplasma por una doble envoltura membranosa con grandes poros que permiten el paso de macromoléculas (ARN y proteínas). Alberga los cromosomas, que contienen casi todo el material genético de las células. Es el sitio de síntesis de ADN y ARN. Los ARN mensajeros, de transferencia y los ribosomas pasan al citosol a través de los poros de la membrana.

2. **Mitocondrias.** En estas organelas se cumplen las etapas de oxidación total de diversos metabolitos y se genera la mayor parte de la energía química producida por las células. Su membrana interna contiene los componentes de la cadena respiratoria (pág. 171).

3. **Retículo endoplásmico (RE).** Es una red de conductos membranosos cuya luz interior ocupa gran parte del volumen de la célula. Parte de este sistema está asociado a ribosomas; por su aspecto al microscopio electrónico, se lo llama *retículo endoplásmico rugoso*. Otro sector del RE, el *retículo endoplásmico liso*, no tiene ribosomas; contiene enzimas relacionadas, entre otras funciones, con la síntesis de lípidos, de hormonas esteroides y el metabolismo de sustancias extrañas (fármacos y productos tóxicos). En su interior se inicia el procesamiento de proteínas que han de ser enviadas a distintos destinos en la célula.

4. **Complejo de Golgi.** Conjunto de sacos membranosos aplanados que recibe las proteínas sintetizadas en el RE, completa su procesamiento y las envía a su destino final. En este sistema se modifican y elongan las cadenas oligosacarídicas de las glicoproteínas; también se sintetizan glicolípidos. Tanto el RE como el Golgi son sacos cerrados; el material que ellos despachan, hacia otros destinos en la célula o hacia el exterior, viaja en vesículas formadas por membrana desprendida de la misma organela.

5. **Lisosomas.** Encierran un conjunto de enzimas hidrolíticas con capacidad para degradar distintas moléculas que la célula debe eliminar. En su interior se mantiene un pH ácido (5,0) con respecto al del citosol. Los productos de la digestión lisosomal pasan al citosol donde son metabolizados o reutilizados en síntesis de nuevas moléculas.

6. **Peroxisomas.** Metabolizan algunos compuestos por reacciones oxidativas que utilizan oxígeno molecular. En estas reacciones se genera peróxido de hidrógeno, eliminado por la catalasa presente en la misma organela.

TRANSPORTE A TRAVÉS DE MEMBRANAS

El continuo tránsito de iones y moléculas entre las células y el medio que las rodea y entre las organelas subcelulares y su entorno, necesariamente debe realizarse a través de membranas. El pasaje de sustancias se cumple por distintos mecanismos, considerados en esta sección.

Difusión

Cuando se agrega un soluto a un solvente adecuado, las partículas de aquél tienden a dispersarse en todo el ámbito ocupado por el solvente. El movimiento de esas partículas, llamado *difusión*, se realiza desde un sitio de mayor a otro de menor concentración de soluto, con una velocidad proporcional a la diferencia de concentraciones o

gradiente. Si la partícula que difunde posee carga eléctrica, además del gradiente de concentración, influye también el de potencial eléctrico entre distintos puntos de la solución. En estos casos se habla de *gradiente de potencial electroquímico*.

En realidad, todas las moléculas disueltas en un solvente líquido o gaseoso están en movimiento continuo, completamente al azar (movimiento browniano). Cuando se agrega soluto para producir un aumento de concentración en un sector de la solución, el movimiento desordenado continúa, pero como el número de partículas por unidad de volumen es más elevado en una zona que en otra, mayor cantidad de moléculas se desplazan desde el sitio de alta hacia el de baja concentración que en sentido contrario. El resultado es un flujo neto o difusión de soluto, cuya dirección y magnitud están relacionadas con el gradiente. La velocidad de flujo depende, además del gradiente, del llamado *coeficiente de difusión* (D), del tamaño de las moléculas, la temperatura y la viscosidad del solvente. La *primera ley de Fick* define el flujo (J) a través de un área determinada (A) en soluciones acuosas, mediante la siguiente ecuación:

$$J = DA\left(-\frac{dC}{dx}\right)$$

donde dC/dx es la diferencia de concentración sobre la distancia x (gradiente de concentración del soluto).

Al cabo de un tiempo se alcanza una distribución uniforme del soluto en el ámbito de la solución. Se llega a un equilibrio en el cual, aunque las moléculas siguen moviéndose en todas direcciones, no hay flujo neto de sustancia en un sentido determinado.

La difusión a favor del gradiente es un proceso *pasivo*; transcurre espontáneamente, sin necesidad de proveer energía al sistema. Se efectúa siempre "cuesta abajo".

El desplazamiento de moléculas por difusión pasiva se puede realizar también entre dos compartimientos acuosos separados por una bicapa lipídica. Por supuesto, la presencia de la membrana representa un impedimento a la difusión libre, ya que las partículas están obligadas a sortear la barrera representada por la doble capa. Las sustancias solubles en lípidos difunden con mayor facilidad a través de la zona hidrofóbica de la membrana. Existe una relación lineal directa entre la velocidad de difusión de una sustancia a través de membranas biológicas y su solubilidad en lípidos (expresada por el llamado *coeficiente de partición aceite/agua**).

Un soluto que entra o sale de células u organelas por difusión, debe atravesar la bicapa lipídica. El interior hidrofóbico de la membrana tiene propiedades solventes muy distintas de las del agua. El flujo depende, entre otros factores, de la *permeabilidad de la membrana* al soluto. En la difusión a través de membranas se aplica también la ley de Fick de difusión simple:

$$J = PA\,(C_1 - C_2)$$

donde J: flujo, P: coeficiente de permeabilidad, A: área considerada, C_1 y C_2: concentraciones del soluto a uno y otro lado de la membrana.

Moléculas no polares pequeñas, como las de O_2, N_2 y CO_2, difunden libremente a través de membranas; también lo hacen compuestos liposolubles de mayor tamaño, como hormonas esteroides y ácidos grasos. El agua y la urea, a pesar de ser polares, atraviesan membranas celulares porque son pequeñas y no poseen carga neta; el flujo de moléculas polares es tanto más difícil cuanto mayor sea su tamaño. Las hexosas, por ejemplo, difunden con gran dificultad. En cuanto a los iones, por pequeños que sean, no pueden atravesar la bicapa lipídica.

La difusión simple se realiza en forma espontánea, con una velocidad directamente proporcional a la diferencia de concentración (gradiente) entre uno y otro lado de la membrana La velocidad de flujo depende del llamado *coeficiente de permeabilidad*, en el cual se consideran varios factores: a) coeficiente de partición, b) movilidad del soluto en la bicapa (el interior de la bicapa, formado por las cadenas hidrocarbonadas, es un medio de mayor viscosidad que el agua), c) espesor de la porción hidrofóbica de la membrana (término medio ~5 nm).

La difusión se realiza en cualquier dirección, siguiendo el gradiente.

Las moléculas que por su tamaño o naturaleza polar tienen bajo coeficiente de permeabilidad difunden lentamente a través de bicapas lipídicas. Sin embargo, el flujo de muchas de esas moléculas a través de membranas biológicas es mayor que el esperado según la ecuación de Fick. Ello se debe a la existencia de estructuras de transporte formadas por proteínas integrales. Entre estas

* Coeficiente de partición aceite/agua: se mide agitando la sustancia en una mezcla de aceite y agua. Cuando las dos fases se separan, se determina la concentración de la sustancia disuelta en cada una de las fases. La relación concentración del soluto en el aceite/concentración del soluto en el agua da el valor del coeficiente de partición.

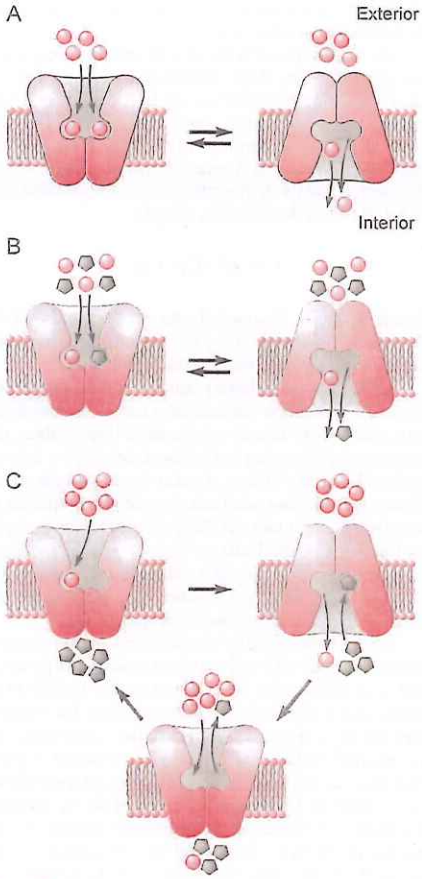


Fig. 11-7. Esquema de modelos hipotéticos de transportadores. La proteína portadora puede existir en dos estados conformacionales: en uno de ellos el sitio de unión de soluto es accesible desde una de las caras de la membrana y en el otro, se expone hacia el lado opuesto. A. *Uniport*: el sitio de unión fija específicamente un soluto determinado. Al unirse éste, se produce el cambio conformacional del portador, que entonces se abre hacia el otro lado y libera el soluto. B. *Cotransporte*: el portador tiene sitios de unión específicos para dos solutos diferentes. En la figura de la izquierda, cada uno se fija a su sitio respectivo. Se produce el cambio conformacional y ambos solutos son liberados hacia la otra cara de la membrana. C. *Contratransporte*: el portador tiene sitios específicos para dos solutos diferentes. En la posición inicial, uno de los solutos se fija en su sitio, se produce el cambio de conformación y con él la transferencia hacia el lado opuesto, desde el cual ingresa el otro soluto, transportado en sentido inverso.

estructuras se distinguen los *portadores* (en inglés *carriers*) y los *canales*.

Portadores y canales están constituidos por cadenas polipeptídicas con múltiples segmentos transmembrana. Estos segmentos forman un pasaje por el cual atraviesan los solutos polares sin entrar en contacto con el interior hidrófobo de la bicapa.

Existen distintos tipos de portadores: a) Transfieren un soluto de uno a otro lado de la membrana. En inglés se los designa sistemas *uniport* o *uniporters* (fig. 11-7 A). b) Transportan simultáneamente dos solutos distintos en la misma dirección, ya sea desde el espacio extracelular hacia el citoplasma o a la inversa. En este caso se habla de *cotransporte* (en inglés *symport* y *symporters* a los cotransportadores involucrados) (fig. 11-7 B). c) Trasladan un soluto en una dirección y otro en sentido opuesto. Se trata de *contratransporte* o *intercambio* (en inglés *antiport* y *antiporter* o *exchanger* al sistema encargado de realizar el transporte) (fig. 11-7 C). Tanto en el cotransporte como en el contratransporte, la transferencia de uno de los solutos está obligatoriamente acoplada con la del otro.

El transporte a través de canales y de buen número de portadores es impulsado por el gradiente químico o electroquímico. Se realiza sin gasto de energía y es denominado *transporte pasivo* o *difusión facilitada*. Existen otros transportadores con capacidad para transferir solutos a través de la membrana aun en contra del gradiente. El proceso, llamado *transporte activo*, requiere aporte energético. En la mayoría de casos éste proviene de la hidrólisis de ATP.

TRANSPORTE PASIVO DIFUSIÓN FACILITADA

A diferencia de la difusión simple, la difusión facilitada muestra especificidad y saturabilidad. En el caso de los portadores, se forma un complejo transportador-soluto similar al complejo enzima-sustrato. Si se representa en un sistema de coordenadas la velocidad de flujo en función de la concentración de soluto, cuando el transporte es facilitado (también cuando es activo) se obtiene una curva hiperbólica (fig. 11-8). La hipérbola es igual a la de actividad enzimática en función de la concentración de sustrato (fig. 8-5), es decir, sigue la cinética de Michaelis-Menten. Este comportamiento indica que el proceso es saturable; cuando todos los portadores en la membrana están ocupados con soluto, se alcanza la velocidad máxima de flujo, que no aumenta más aunque se incremente la concentración de soluto.

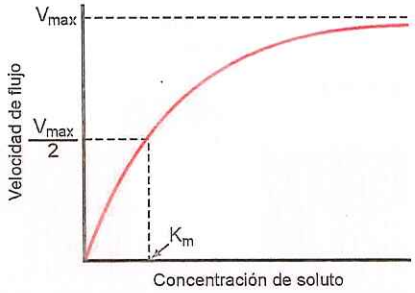


Fig. 11-8. Representación gráfica de la velocidad de flujo en función de la concentración de soluto en un proceso de difusión facilitada (igual tipo de curva se obtiene para el transporte activo). La curva es una hipérbola (cinética de Michaelis-Menten).

Se puede definir una constante K_m o $K_{0.5}$, correspondiente a la concentración de soluto a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima de flujo. En casi todos los casos, el valor de K_m tiene una relación inversa con la afinidad del transportador por el soluto. A menor valor de K_m, mayor afinidad y viceversa.

La velocidad de flujo del soluto en este tipo de sistema puede expresarse por una ecuación similar a la de Michaelis-Menten:

$$J = \frac{J_{max}\,[S]}{K_m + [S]}$$

donde J: velocidad de flujo, Jmax: velocidad máxima de flujo, [S]: concentración de soluto, Km: concentración de soluto con la cual el flujo es igual a la mitad del máximo.

Las características de saturabilidad son las mismas para transporte activo y facilitado.

Como para las enzimas, sustancias con estructura molecular parecida a la del soluto específico pueden unirse al sitio de soluto en el transportador y producir inhibición competitiva. También se da inhibición no competitiva. El valor de K_m y tipo de inhibición pueden determinarse experimentalmente (ver págs. 154 a 157).

El proceso facilitado se realiza siempre a favor del gradiente. Si la relación de concentraciones o de potencial electroquímico a uno y otro lado de la membrana se invierte, también se invierte el sentido del flujo. El gradiente es la fuerza impulsora de la difusión facilitada, que no necesita acoplarse a una fuente de energía. Desde este punto de vista, la difusión facilitada es similar a la difusión simple; la diferencia reside en la participación de una proteína mediadora o transportadora en la primera; en la segunda no interviene mediador alguno.

Transportadores de difusión facilitada

Se han identificado numerosas proteínas que facilitan la difusión de solutos hidrófilos en ambos sentidos a través de membranas, tanto plasmática como de organelas. Debido a su similitud con las enzimas, se suele llamar *permeasas* a los portadores. A continuación se presentan algunos encargados de transportar solutos orgánicos.

Transportadores de glucosa. Constituyen una familia de proteínas ampliamente distribuida en el organismo, encargada de asegurar la provisión de glucosa y otras hexosas a las células. Son *uniporters* muy selectivos; reconocen los isómeros D pero no los L. Se han descrito distintas clases de estos transportadores, que difieren en propiedades cinéticas, regulación y localización tisular; son designados con las siglas GLUT y un número (de 1 a 14). De acuerdo con su estructura primaria, los GLUT se han clasificado en 3 grupos; la clase I incluye los GLUT 1-2-3-4 y 14, que fueron los primeros en ser caracterizados. GLUT 1 se expresa en prácticamente todas las células y es el encargado del transporte basal de glucosa. GLUT 2 es el responsable de la absorción de glucosa en riñón e intestino y es el sensor de glucosa en células β del páncreas. GLUT 3 es la forma neuronal. GLUT 4 es el transportador del músculo esquelético y tejido adiposo; su expresión y función en la membrana son reguladas por insulina. La clase II está integrada por los GLUT 5-7-9 y 11. El GLUT 5 es un transportador específico de fructosa en el intestino. Finalmente, la clase III, que incluye GLUT 6-8-10-12 y 13, puede transportar no sólo glucosa, sino también fructosa y galactosa en cerebro, músculo, hígado, corazón y pulmón.

Si bien existen algunas diferencias en secuencia de aminoácidos entre los distintos portadores, su estructura general es semejante. GLUT 1 es un dímero y los otros son monómeros o multímeros de una subunidad de unos 500 aminoácidos, con doce segmentos α-hélice transmembrana; sus extremos amino y carboxilo terminales se encuentran hacia la faz citoplásmica y el asa externa que conecta las hélices 1 y 2 está glicosilada.

Más adelante (pág. 256) se considerarán las características funcionales de estos transportadores.

Transportadores de urea. Comprenden una serie de proteínas que facilitan el movimiento pasivo de urea a través de la membrana plasmática. Se conocen como UT (del inglés *urea transporters*) e incluyen 2 clases: los trasportadores del túbulo

renal, o UTA, con cinco formas distintas (UTA 1 a 5) y el transportador del eritrocito, o UTB. Los UTA intervienen en la absorción y secreción de urea en los túbulos renales, y en su reciclaje en la médula renal. Esto contribuye a mantener niveles altos de urea en el intersticio renal, lo que es importante para el mecanismo de contracorriente que permite al riñón controlar la concentración de la orina. El UTB facilita la entrada y salida de urea en el eritrocito mientras atraviesa la médula renal, lo que serviría para mantener el balance osmótico de estas células en el medio hipertónico del riñón. Los UT están constituidos por dos porciones hidrofóbicas, cada una de las cuales posee cinco dominios transmembrana, conectados entre sí por un segmento extracelular glicosilado. El UTA 1 es el mayor de todos y esta constituido por una duplicación de esta estructura básica.

Intercambiadores de cationes y aniones. Median el ingreso y salida de la célula de sustancias orgánicas con carga positiva o negativa que se producen en el organismo (dopamina, adrenalina, serotonina, colina, histamina, prostaglandinas, etc.), o participan en la destoxificación de moléculas exógenas de estructura variada (drogas). Movilizan cargas, por lo que son electrogénicos. Los intercambiadores de cationes pertenecen al subtipo OCT (del inglés *organic cation transporters*), mientras que los intercambiadores de aniones conforman el grupo de los OAT (del inglés *organic anion transporters*). Como para otros sistemas de transporte, los OCT y OAT poseen múltiples formas moleculares que se expresan principalmente en hígado, riñón e intestino.

Canales

Forman poros o túneles hidrofílicos a través de la membrana. En ellos el pasaje de solutos se hace siempre espontáneamente, a favor del gradiente, sin aporte de energía adicional.

Mientras los portadores o permeasas alcanzan a transferir como máximo 10^5 partículas por segundo, en los canales la velocidad de transporte es mucho mayor (hasta 10^8 por segundo). Esto les permite mediar en la transmisión de señales rápidas, como las determinantes de impulsos nerviosos, contracción muscular y otras respuestas biológicas. Los canales difieren de los portadores en el modo de reconocer el soluto. El portador dispone de un sitio de unión al cual sólo puede fijarse el sustrato específico, en cambio, los canales discriminan el soluto por su tamaño y por su carga (fig. 11-9).

La mayoría de los canales conocidos dejan pasar iones. Se han descrito numerosos *canales de iones* en diversos tipos celulares, tanto en membrana plasmática como en la de organelas. Son altamente selectivos para una especie de ion pequeño (Na^+, K^+, Ca^{2+}, Cl^-).

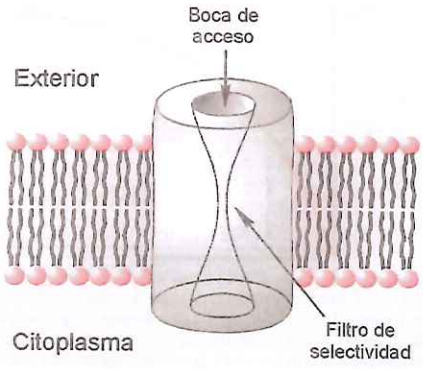


Fig. 11-9. Representación muy esquemática de un canal de iones.

Existen notorias diferencias entre las concentraciones de algunos solutos a uno y otro lado de la membrana plasmática, debidas a la actividad de sistemas de transporte activo que utilizan la energía de hidrólisis de ATP para impulsar el paso de sustancias contra gradiente. En cuanto a los iones, el K^+ es el catión predominante en el interior de las células, mientras el Na^+ lo es del espacio extracelular. La distribución de aniones también muestra diferencias a uno y otro lado de la membrana (pág. 616).

Los gradientes de concentración y el transporte selectivo de iones crea una diferencia de potencial a través de la membrana que, dependiendo del tipo celular, varía alrededor de ~70 mV (milivoltios), con el interior negativo respecto al exterior. Se dice que la membrana está "polarizada". El movimiento de partículas con carga representa una corriente eléctrica; por ello los canales de iones juegan un papel fundamental en la actividad de tejidos excitables como el nervioso y muscular. En ellos, el ingreso de Na^+ o Ca^{2+} a través de la membrana reduce la carga negativa intracelular y produce "despolarización" de la membrana. La salida de K^+, o entrada de Cl^-, tiende a revertir la situación y causa "repolarización" de la membrana.

El flujo de un ion es impulsado por el gradiente electroquímico resultante de la sumatoria de los gradientes de potencial eléctrico y de concentración del ion a uno y otro lado de la membrana. En células no estimuladas, el interior electronegativo favorece el ingreso, y dificulta el escape,

de iones positivos (la situación inversa se da para iones negativos). En el caso del K^+, por ejemplo, el gradiente eléctrico se opone a su salida de la célula; en cambio, el gradiente de concentración (140 a 150 mM en el interior, 5 mM en el espacio extracelular) favorece su egreso. Cuando estas dos fuerzas opuestas se equilibran, el gradiente electroquímico es cero y no hay flujo neto del ion. En la mayoría de las células, el K^+ está próximo al equilibrio, ya que el potencial de membrana contrarresta el gradiente de concentración.

Según la ecuación de Nernst, el potencial de equilibrio de un ion se puede calcular conociendo sus concentraciones intra- y extracelular:

$$V = \frac{RT}{zF} \cdot 1n \frac{C_e}{C_i} = 2{,}303 \frac{RT}{zF} \cdot \log \frac{C_e}{C_i}$$

donde V: potencial de equilibrio en voltios; R: constante de los gases [8,31 J (1,987 cal) · mol^{-1} · $°K^{-1}$]; T: temperatura absoluta; F: constante de Faraday (96 kJ · V^{-1}); z: carga del ion; C_e y C_i: concentraciones extra- e intracelular.

El conocimiento de la estructura y función de los canales de iones ha experimentado grandes avances con la utilización de métodos de biología y genética molecular y la adquisición de técnicas electrofisiológicas como el *patch clamp*, que permite aislar en la punta de una micropipeta un trozo de membrana de 1 μm de diámetro y analizar el comportamiento de sólo un canal.

Los canales, además de constituir un poro, poseen otras regiones de gran importancia funcional. Dentro del canal existe una zona que forma el *filtro de selectividad*, que sólo deja pasar, de a uno, el ion de tamaño y carga adecuados. Además, tienen una "compuerta", o dispositivo encargado del cierre y apertura del canal. Esta compuerta está accionada por determinados estímulos. En algunos canales la apertura se produce en respuesta a un cambio del potencial de la membrana; se dice que el canal es *dependiente de voltaje* (en inglés *voltage-gated channel*). En otros, la unión de una sustancia señal o intermediario químico abre el poro; son los *dependientes de ligando* (*ligand-gated channel*). Hay canales que fijan ligandos no covalentemente a un sitio específico en la faz extracelular del canal, mientras otros son activados por ligandos intracelulares. Algunos, en cambio, son sensibles a estímulos mecánicos (ej.: los del órgano de la audición). Los canales están permanentemente oscilando del estado abierto al cerrado. El estudio de la corriente iónica a través del canal permite medir el tiempo en el cual éste permanece abierto y permite establecer la *probabilidad de apertura*, lo que define las propiedades electrofisiológicas del canal.

Se ha descrito una enorme cantidad de canales de distinta especificidad y propiedades. A continuación se presentan algunos de ellos.

Canales de K^+, Na^+ y Ca^{2+} dependientes de voltaje. Son responsables de las señales eléctricas en células excitables. Conducen con gran selectividad sus respectivos cationes a velocidades aproximadas a la difusión libre, es decir, son extraordinariamente eficientes. La apertura y cierre regulados de estos canales determinan la formación de potenciales de acción en nervio y músculo. Poco tiempo (milisegundos) después de su apertura, se inactivan e interrumpen el flujo de soluto. Así, los canales de cationes dependientes de voltaje pueden encontrarse en diferentes estados: a) reposo (cerrado), b) activado (abierto) y c) inactivado (cerrado). La activación por cambios de voltaje de los canales de Na^+ permite la entrada de este catión a la célula y la generación de la fase inicial rápida del potencial de acción. La apertura de los canales de K^+ dependientes de voltaje se produce durante la fase de despolarización; esto facilita la salida de K^+ de la célula y contribuye al retorno del potencial de reposo en la membrana. El flujo iónico a través de los canales de Ca^{2+} induce la entrada del ion en la célula y produce una corriente de despolarización sostenida que perpetúa el potencial de acción en ciertas células como las cardíacas. Además, el ingreso de Ca^{2+} a través de canales es el determinante de la contracción muscular y de numerosos procesos en los que este catión sirve como mensajero intracelular.

Se han identificado varios canales de K^+, Na^+ y Ca^{2+} sensibles a cambios de voltaje. Su estructura es parecida; todos son polímeros constituidos por varias cadenas polipeptídicas. El poro está formado por subunidades llamadas α. En muchos existen otras subunidades que, si bien no participan en la construcción del canal, contribuyen a su funcionamiento.

La subunidad α de los canales de Na^+ y Ca^{2+} es una larga cadena polipeptídica que contiene extremos N- y C-terminal intracelulares y cuatro dominios con seis segmentos transmembrana cada uno (fig. 11-10). En cambio, en los canales de K^+ existen cuatro subunidades α, cada una de ellas homóloga a uno de los dominios de canales de Na^+ y Ca^{2+} (fig. 11-11).

En todas estas estructuras, el cuarto segmento transmembrana actúa como sensor de los cambios de voltaje. El asa que conecta los segmentos quinto y sexto penetra hasta la mitad de la bicapa y sería responsable de la discriminación del ion. Una porción del complejo proteico cumple funciones de tapa o compuerta del poro, encargada del cierre y apertura.

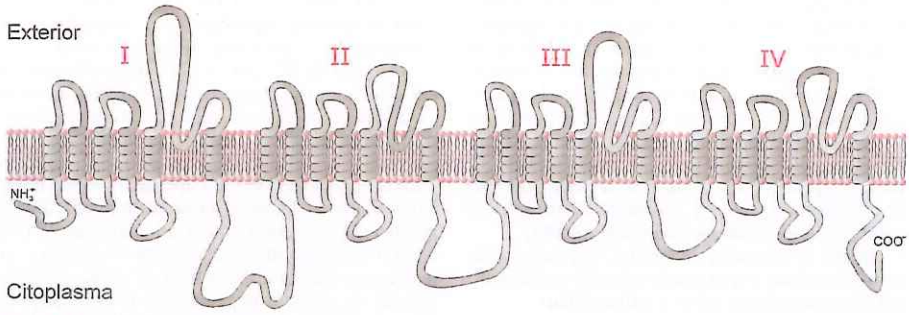


Fig. 11-10. Estructura de canales de Na^+ y Ca^+ dependientes de voltaje. Están formados por una cadena polipeptídica con cuatro dominios repetidos. Cada uno de estos dominios es similar a una de las cuatro subunidades de los canales de K^+.

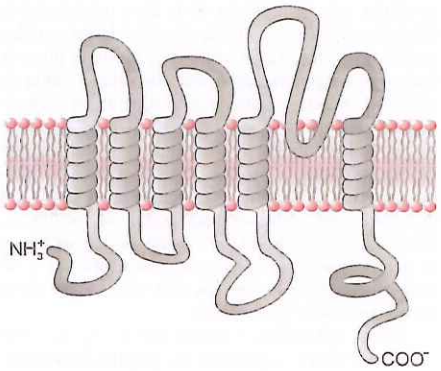


Fig. 11-11. Estructura de una de las cuatro subunidades que forman un canal de K^+ dependiente de voltaje. Cada subunidad tiene seis hélices α transmembrana.

Canales de K^+ no dependientes de voltaje. Otro grupo de canales de K^+ es el conocido como rectificador interno, o K_{ir}. Se lo encuentra predominantemente en células del músculo esquelético y cardíaco, es el responsable de mantener la conductancia para K^+ en condiciones de reposo y así contribuye a mantener el potencial de membrana en equilibrio. Este canal es un tetrámero, constituido por unidades que poseen dos segmentos similares a los dominios transmembrana 5 y 6 de los canales de K^+ sensibles a voltaje. Ambos segmentos de este canal están unidos por el lado extracelular y forman una estructura cónica con el vértice orientado hacia el citoplasma.

Canales dependientes de ligandos extracelulares. A esta categoría pertenecen los receptores nicotínicos de acetilcolina, de ácido γ-aminobutírico, de glicina, de glutamato, de serotonina tipo 3 (5-HT3), todos canales de iones comprometidos en la transmisión sináptica. Son descriptos en la página 504, al tratar tejido nervioso. Su estructura general presenta complejos oligoméricos de cinco subunidades con cuatro segmentos α-hélice transmembrana cada una.

Canales dependientes de nucleótidos cíclicos (ligandos intracelulares). Son sensibles a "mensajeros" intracelulares. Entre ellos se encuentran los canales activados por GMP cíclico, presentes en corazón, riñón, retina (conos y bastoncillos) y órgano olfatorio. Tienen alta permeabilidad para el Ca^{2+}. Su estructura es similar a la de canales de K^+ dependientes de voltaje, con un sitio específico para la unión de los nucleótidos en el extremo C-terminal.

Canales de Na^+ sensibles a amilorida. Se encuentran en la membrana apical de células epiteliales encargadas de la absorción de NaCl. Los de tubos colectores de riñón son regulados por aldosterona. Compuestos por tres subunidades (α, β y γ), cada una con dos hélices transmembrana y un asa exterior fuertemente glicosilada a la cual se une la amilorida, fármaco que bloquea el canal, impide la reabsorción de Na^+ y, en consecuencia, tiene acción diurética.

Canales de cloruros. Además de Cl^- dejan pasar otros aniones pequeños. Se los encuentra en todas las células y desempeñan un papel importante en el transporte epitelial de Cl^-, la regulación del volumen celular, acidificación de organelas, estabilización de potenciales de membrana, etc. Se conocen varias clases diferentes de estos canales.

Los canales de iones son el blanco de gran número de agentes farmacológicos que tienen importante aplicación en clínica.

Se han identificado diversas alteraciones hereditarias debidas a mutaciones en genes que codifican proteínas de canales. Se llama *canalopatías* a este tipo de enfermedades.

Ionóforos. Existen sustancias que al incorporarse a membranas biológicas aumentan su permeabilidad a ciertos iones; se las denomina *ionóforos*. Son moléculas de tamaño relativamente pequeño, con una superficie hidrofóbica que les permite ingresar en la bicapa lipídica. Se conocen dos tipos de ionóforos, los portadores móviles y los formadores de canales.

Portadores móviles. Fijan el ion en una cara de la membrana, lo engloban en el interior de la molécula, cruzan la bicapa y liberan el ion del otro lado. A este grupo pertenece el antibiótico *valinomicina*, un péptido en forma de anillo que transfiere K^+ de una faz a otra de la membrana. Otro ionóforo de esta clase es el A 23187, que transfiere Ca^{2+} y Mg^{2+}. Es utilizado en experimentos en los cuales se desea incrementar rápidamente la concentración intracelular de Ca^{2+}.

Formadores de canales. Se insertan en la membrana generando un conducto hidrófilo, por el cual pueden pasar los iones. Un ejemplo es la *gramicidina A*, péptido constituido por 15 restos aminoacídicos. El poro transmembrana por el cual atraviesan cationes monovalentes (H^+, K^+, Na^+) se forma por la unión de dos moléculas del antibiótico, una a continuación de la otra.

Como los canales, los ionóforos permiten el flujo de iones únicamente en la dirección determinada por el gradiente electroquímico.

Canales de agua - Acuaporinas

El agua, molécula polar, es prácticamente insoluble en lípidos. Si bien esta propiedad restringe su pasaje a través de membranas celulares, éstas permiten cierto flujo, impulsado por el gradiente osmótico. Sin embargo, había llamado la atención que algunas células presentaban una permeabilidad al agua muy superior a la explicable por simple difusión a través de la bicapa lipídica. Esta observación llevó a proponer la existencia de poros o canales para el paso del agua. La hipótesis fue corroborada por el aislamiento de proteínas formadoras de esos canales. Ellas constituyen una familia, compuesta por trece isoformas. Se las llama genéricamente *acuaporinas* y se las designa con las siglas AQP y un número (de 0 a 12).

El análisis de hidrofobicidad de aminoácidos en la cadena polipeptídica de acuaporinas indica la existencia de seis α-hélices transmembrana. Los extremos N- y C-terminal son intracelulares (fig. 11-12). Las hélices α 1, 2 y 6 por un lado y las 3, 4 y 5 por otro, se disponen enfrentadas simétricamente para formar el poro. Las asas que conectan las hélices 2 y 3 y las 5 y 6, hidrofóbicas, se introducen en la bicapa desde el lado intra y extracelular respectivamente, creando una estructura en reloj de arena, por donde las moléculas de agua pasan de a una por vez (fig, 11-13). En el canal de agua mejor conocido (AQP1), se asocian cuatro de estas subunidades, de las cuales sólo una está glicosilada. Cada monómero funciona como un canal independiente. El canal es bloqueado por compuestos órgano-mercuriales que se unen a un resto cisteína de la proteína.

Todas las acuaporinas permiten el paso de agua, que se mueve siguiendo el sentido impuesto por el gradiente osmótico. AQP 0, 1, 2, 4, 5, y 6 transportan exclusivamente agua; además de agua, las restantes son también permeables a otras sustancias. AQP 3, 7, 9 y 10 permiten el paso de glicerol y se las conoce como acuagliceroporinas; AQP 7 y 8, son permeable a urea, AQP 9, a solutos de mayor masa, como polioles y purinas. Las diversas especies de acuaporinas están ampliamente distribuidas en el organismo y presentan una localización que es específica para cada tejido:

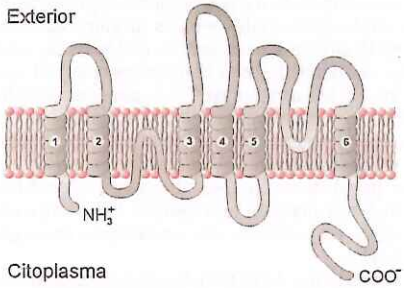


Fig. 11-12. Estructura de acuaporina 1 (AQP1).

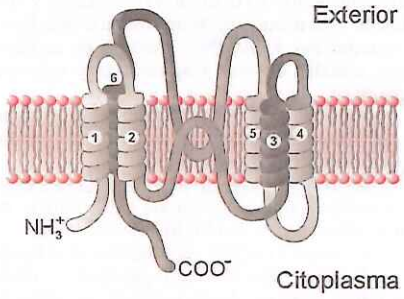


Fig. 11-13. Representación esquemática de una unidad de AQP1. El canal está formado en parte por el asa entre las hélices 2 y 3 y la que conecta las hélices 5 y 6, que se introducen en la membrana (estructura en "reloj de arena").

Acuaporina 0 (AQP0). Se encuentra en la membrana de fibras del cristalino. Tiene reducida actividad como canal de agua y quizá su función principal sea mantener la transparencia del cristalino. En ratones con una mutación en el gen de AQP0 se produce un cuadro de cataratas.

Acuaporina 1 (AQP1). Fue la primera reconocida como canal de agua, inicialmente aislada de la membrana de glóbulos rojos. También está presente en membranas apical y basolateral de células de tubos proximales del nefrón, rama descendente del asa de Henle y vasa recta; en células endoteliales de capilares, microvellosidades de plexo coroideo, en el tracto reproductivo masculino, epitelio de vesícula biliar y pulpa roja del bazo.

Acuaporina 2 (AQP2). Localizada exclusivamente en células principales de tubos colectores de riñón. Cuando las células no están activadas, la mayor parte de la AQP2 está inserta en membranas de vesículas endosomales; en estas condiciones, la membrana apical tiene baja permeabilidad al agua. La unión de hormona antidiurética de neurohipófisis a sus receptores específicos en las células principales renales produce aumento de AMP cíclico y promueve la fusión de las vesículas endosomales con la membrana apical, que recibe así los canales AQP2 y aumenta notablemente su permeabilidad al agua. Estos canales son responsables de la reabsorción facultativa de aproximadamente 16 litros de agua por día. Este papel de acuaporina 2 explica los cuadros de diabetes insípida nefrogénica hereditaria observados en pacientes con mutaciones en el gen de AQP2.

Acuaporina 3 (AQP3). Se encuentra en membrana basolateral de células de tubos colectores renales; junto con AQP 2, son importantes en el proceso de concentración de orina. AQP 3 también se encuentra en conjuntiva, meninges y epitelios de vías urinarias, respiratorias e intestino.

Acuaporina 4 (AQP4). Presente en cerebro, retina, epitelio de vías respiratorias y músculo esquelético.

Acuaporina 5 (AQP5). Se localiza en glándulas salivales y lacrimales, epitelio corneal y glándulas submucosas de vías aéreas.

Acuaporina 6 (AQP6). Es detectada predominantemente en compartimientos intracelulares de células intercaladas de túbulo colector renal.

Acuaporina 7 (AQP7). Abundante en el borde en cepillo de células de túbulo proximal de riñón y en tejido adiposo, donde mediaría la salida de glicerol de las células.

Acuaporina 8 (AQP8). Se expresa en hígado, páncreas, intestino delgado, colon, placenta y testículo.

Acuaporina 9 (AQP9). Principalmente en hígado, pulmón, bazo, médula ósea y leucocitos.

Acuaporina 10 (AQP10). Es la forma de acuaporina del intestino.

Acuaporina 11 y 12 (AQP11-12). Se encuentran en el retículo endoplásmico de hígado, cerebro y páncreas.

Es claro que estos canales representan un mecanismo homeostático importante en el control del balance del agua a nivel celular y de todo el organismo; la alteración en su función se asocia a diferentes trastornos clínicos.

Canales entre células

También llamados *uniones comunicantes*, *conexones o nexos,* forman canales que comunican el citoplasma de células adyacentes. Permiten el intercambio directo de iones y moléculas pequeñas como nucleótidos cíclicos, IP_3 y glucosa entre una célula y su vecina, sin pasar por el espacio intersticial. En inglés se los designa *gap junctions*.

Se encuentran en casi todas las células, salvo en aquellas que circulan libres, como las de la sangre.

Al comunicar células contiguas, estos poros cumplen un papel integrador, ayudan a coordinar la respuesta de grupos celulares y a regular la función de los tejidos. Son poco selectivos; además de iones y metabolitos diversos, pasan a su través "mensajeros" de sistemas de señales como AMP cíclico, que contribuyen a coordinar las respuestas celulares. En tejidos excitables, por ejemplo músculo cardíaco, el pasaje directo de iones (Ca^{2+}) a través de estos canales sincroniza la contracción de miofibrillas vecinas.

Los conexones están constituidos por dos hemicanales juxtapuestos, cada uno de los cuales pertenece a cada una de las células que participan en la unión. Estos hemicanales están formados por un hexámero de una proteína llamada *conexina*, de unos 30 kDa, cuatro segmentos transmembrana y extremos N- y C- terminal orientados hacia el citoplasma. Las seis subunidades forman un cilindro con un poro, que permite el paso de los solutos (fig. 11-14). La apertura y cierre del canal esta regulado por Ca^{2+} y depende de un cambio conformacional de las subunidades que produce su giro en el plano perpendicular a la membrana.

Las conexinas comprenden una familia de proteínas homólogas. Existen unas veinte formas distintas, que se designan con las siglas CX y un número que indica su masa molecular. Cada conexón está formado por el mismo tipo de conexinas, o por varias diferentes, pero cada clase de conexina sólo se ensambla y forma canales con

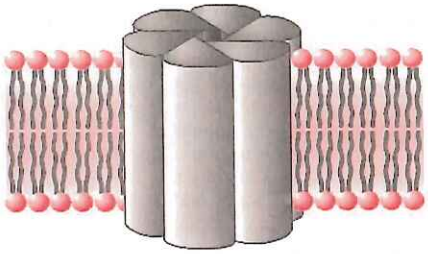


Fig. 11-14. Representación esquemática de un conexón o nexus.

subunidades de células de un mismo tejido. Por ejemplo, un nexo de células endoteliales no puede unirse para formar un poro con otro de células musculares.

TRANSPORTE ACTIVO

La difusión simple o la facilitada se realizan a favor del gradiente y tiene un ΔG negativo. Cuando el flujo de sustancia se hace en dirección opuesta al gradiente, es decir "cuesta arriba", el ΔG es positivo y sólo puede realizarse si se provee energía al sistema. En este caso se habla de *transporte activo*; el acoplamiento con una reacción exergónica suministra la energía necesaria para impulsar el flujo de moléculas o iones en la dirección termodinámicamente desfavorable. En la mayoría de los casos, el transporte se acopla a la hidrólisis de ATP. Alrededor del 50% del ATP producido por las células se invierte en actividades de transporte activo, lo que indica la importancia fisiológica de estos procesos.

El transporte activo es mediado por transportadores proteínicos y tiene las mismas características de especificidad y saturabilidad descritas para la difusión facilitada.

Los transportadores responsables de mantener los gradientes de iones a través de la membrana son importantes ejemplos de transporte activo. Estos transportadores o "bombas de iones" se agrupan en tres clases, denominadas ATPasas P, F y V. Consideraremos las más importantes.

ATPasas clase P

La estructura básica es semejante para todas ellas. Están compuestas por una subunidad mayor o α de unos 100 kDa, responsable de la actividad ATPasa, que posee el sitio de unión de ATP; se fosforila de manera transitoria durante el proceso de transporte (lo que da a estas ATPasas su nombre de clase P) y forma el pasaje por donde se desplazan los iones. Las ATPasas que transportan más de un tipo diferente de ion tienen además una segunda subunidad llamada β, que es importante en el proceso de síntesis y ensamble del transportador a la membrana plasmática. Pertenecen al tipo P, la Na^+,K^+-ATPasa, las Ca^{2+}-ATPasas y la H^+,K^+-ATPasa.

Na^+, K^+-ATPasa

Uno de los sistemas de transporte activo más difundidos es el responsable del mantenimiento de la diferencia en las concentraciones de Na^+ y K^+ de los líquidos intra- y extracelular. Comúnmente se lo llama "bomba de sodio"; se encuentra inserta en la membrana plasmática de la inmensa mayoría de células, desde donde expulsa Na^+ hacia el espacio extracelular e introduce K^+ en el citoplasma (fig. 11-15). La bomba de sodio ha sido identificada con la Na+,K+-ATPasa, un contratransportador o *antiporter*.

La masa del complejo aislado indica que la Na+,K+-ATPasa está formada por al menos dos subunidades α y dos β. La subunidad α, con una masa de alrededor de 100 kDa, atraviesa la membrana diez veces; la β, una glicoproteína de unos 45 kDa, atraviesa la membrana sólo una vez y tiene cadenas de oligosacáridos unidas a su cara externa. También se ha descripto una tercera subunidad hidrofóbica, de unos 8 kDa, denominada γ. Este polipéptido se expresa sólo en algunas células (ej.: en riñón) y parece actuar como un regulador de la función de la Na^+,K^+-ATPasa. La reciente obtención de cristales de la Na^+,K^+-ATPasa ha aportado grandes avances en el conocimiento de la estructura molecular de este transportador y de otras ATPasas de la clase

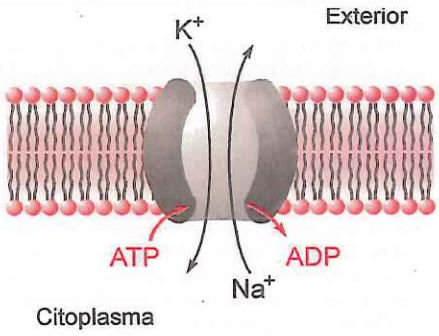


Fig. 11-15. Acción de la bomba de sodio (Na^+,K^+-ATPasa)

P. Todas poseen la mayor parte de la molécula del lado citoplásmico, en donde se pueden distinguir tres dominios: el A o "actuante", que comprende el extremo N-terminal; el P o de "fosforilación" y el N o de "unión de nucleótido", localizados entre los dominios transmembrana 4 y 5. El movimiento relativo de estos dominios se repite de manera cíclica durante la reacción de transporte de iones catalizada por la Na^+,K^+-ATPasa.

Los lípidos de la membrana asociados a las cadenas polipeptídicas tienen importancia en el funcionamiento de la bomba, ya que ésta se inactiva cuando se la aísla y se le extraen totalmente los lípidos que la acompañan.

La subunidad α tiene sitios específicos de alta afinidad para la fijación de Na^+ próximos a su faz interna o citoplasmática y para la unión de K^+ en su cara externa. En condiciones normales la transferencia de Na^+ hacia el exterior y la de K^+ hacia adentro están acopladas; no puede realizarse una sin que se produzca la otra. El resultado del funcionamiento de la bomba es el intercambio de Na^+ intracelular por K^+ extracelular. Ambos flujos se realizan contra el gradiente y es necesario proveer energía, la cual se obtiene de la hidrólisis de ATP. La Na^+,K^+-ATPasa cataliza la hidrólisis de ATP en una reacción que requiere la presencia de Na^+, K^+ y Mg^{2+}. El ATP se une a un sitio específico de la subunidad α en la faz citoplasmática de la membrana y su hidrólisis es acoplada al transporte de iones. Cada mol de ATP hidrolizado posibilita el transporte de 3 moles de Na^+ hacia el espacio extracelular y 2 moles de K^+ hacia el citoplasma. El resultado del funcionamiento de la bomba puede resumirse en la siguiente ecuación:

$$3\ Na^+_i + 2\ K^+_e + ATP \rightarrow 3\ Na^+_e + 2\ K^+_i + ADP + P_i$$

Los subíndices *i* y *e* junto a los símbolos Na^+ y K^+ indican intracelular y extracelular respectivamente.

El sentido del flujo iónico puede revertirse si se aumentan las concentraciones de Na^+_e, K^+_i, ADP y P_i. En ese caso, la Na^+,K^+-ATPasa actúa como ATP sintasa.

Normalmente la bomba funciona de acuerdo con la ecuación expuesta: expele 3 Na^+ por cada 2 K^+ que ingresa al citosol. De esta manera, crea una diferencia de potencial a ambos lados de la membrana; es *electrogénica*. Debido a esta propiedad, la bomba de sodio contribuye al mantenimiento del potencial de reposo celular y posibilita el disparo de potenciales de acción de membrana y la excitabilidad celular.

La Na^+,K^+-ATPasa sufre, durante su ciclo de reacción, la fosforilación y desfosforilación alternativa de su subunidad α, lo que determina un cambio conformacional reversible de este polipéptido y la translocación de los iones. De los mecanismos propuestos para explicar la acción de la enzima, el que más se ajusta a los hechos experimentales es el siguiente:

1. En la conformación conocida como E1 la subunidad α de la enzima une con alta afinidad ATP, Mg^{2+} y tres iones Na^+, que acceden fácilmente desde la faz citoplasmática. Se produce hidrólisis del ATP y el tercer resto fosforilo (γ) es transferido al carboxilo de un resto aspartato en la subunidad α.

2. Los tres iones Na^+ quedan atrapados por la enzima fosforilada; se libera ADP y se produce un cambio conformacional (conformación E2) como resultado del cual el sodio y los sitios de unión quedan expuestos al exterior de la célula, disminuye la afinidad para el catión y los iones Na^+ son liberados hacia el espacio intersticial.

3. Dos iones K^+ se fijan a sitios de alta afinidad, accesibles desde la superficie externa de la enzima fosforilada. La unión del K^+ promueve la liberación del fosfato ligado a la enzima.

4. Los iones potasio son atrapados por la enzima desfosforilada. La unión de ATP, ahora a sitios de baja afinidad, promueve un nuevo cambio conformacional para volver a E1. La enzima disminuye su afinidad para el K^+, que queda expuesto hacia el interior de la célula y es liberado en el citosol.

Este mecanismo ha sido representado esquemáticamente en la figura 11-16.

Tanto la subunidad α como la β presentan distintas formas moleculares o isoformas, codificadas por genes diferentes. Cuatro polipéptidos α (α_1, α_2, α_3 y α_4) y tres β (β_1, β_2 y β_3) se expresan de manera variable, dependiendo del tipo celular y del desarrollo celular.

La Na^+,K^+-ATPasa es el receptor al que se unen glicósidos del tipo de ouabaína y digitoxigenina. La mayoría de estos compuestos, de estructura esteroidea, son de origen vegetal y se utilizan en clínica como cardiotónicos. Estas sustancias se fijan a la superficie externa de la subunidad α de la bomba de sodio y en concentraciones de $\sim 10^{-5}$ M bloquean el transporte de Na^+ y K^+. La inhibición de la Na^+,K^+-ATPasa por los glicósidos cardiotónicos produce aumento de la concentración intracelular de Na^+, cuya consecuencia inmediata es la reducción del potencial electroquímico de la membrana para el Na^+. Como este potencial es el que promueve los procesos de transporte activo secundario (ver más adelante), entre los cuales se cuenta el contratransporte Na^+/Ca^{2+}, se expulsa menos calcio del citoplasma, aumentan

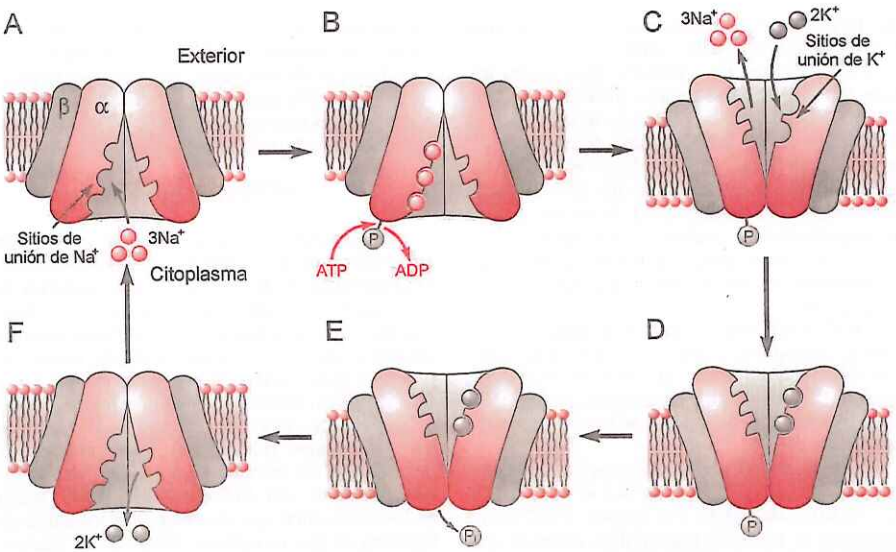


Fig. 11-16. Representación esquemática del posible mecanismo de acción de la Na^+,K^+-ATPasa. **A.** Conformación E_1. Los sitios de fijación de Na^+ son accesibles desde la cara interna de la membrana; se une ATP-Mg^{2+} con alta afinidad. **B.** Se han fijado tres iones Na^+ a sus respectivos sitios; se produce hidrólisis de ATP y se fosforila la subunidad α, lo que induce un cambio conformacional. **C.** Conformación E_2. Se liberan 3 Na^+ hacia el exterior y se exponen los sitios de K^+. **D.** Dos iones K^+ se fijan a sus sitios. **E.** Se separa el resto fosforilo de la subunidad α. **F.** Se produce un nuevo cambio conformacional que permite liberar los dos iones K^+ hacia el citoplasma y volver a la situación inicial.

las reservas de calcio en retículo sarcoplásmico, se incrementa la liberación de Ca^{2+} durante la sístole y esto mejora la contractilidad cardíaca. Recientemente se ha descubierto que ouabaína es una sustancia que se sintetiza de manera endógena en la glándula suprarrenal de mamíferos y y actúa como una hormona. Una vez liberada a la circulación ouabaína actúa como un regulador de la función de la Na^+,K^+-ATPasa y es capaz de modular el metabolismo, crecimiento, adhesión y muerte celular.

Ca^{2+}-ATPasa

La concentración de calcio en el citoplasma de las células se mantiene en niveles bajísimos (hasta 10.000 veces menores que los existentes en el líquido extracelular) debido a la existencia de sistemas que expulsan el Ca^{2+} citosólico al exterior o lo envían a compartimientos intracelulares. Todas las células poseen bombas de Ca^{2+} en la membrana plasmática y en membranas del retículo endoplásmico (RE); la mejor conocida es la de retículo sarcoplásmico (RS), equivalente a RE en células musculares. Estas bombas tienen una estructura y funcionamiento semejante a la Na^+,K^+-ATPasa, excepto que son *uniporters* en vez de *antiporters*. Poseen una única subunidad α con diez segmentos transmembrana, en cuya faz citoplásmica se encuentran sitios específicos de alta afinidad para Ca^{2+} y ATP; requieren Mg^{2+} y catalizan la hidrólisis de ATP a ADP y P_i.

Ca^{2+}-ATPasa de membrana plasmática. Llamada PMCA, transfiere un ion Ca^{2+} por cada molécula de ATP hidrolizada, contribuye a regular los niveles de Ca^{2+} en el citosol. El aumento en éste de la concentración de Ca^{2+} libre promueve su unión con una proteína llamada *calmodulina* (pág. 502). El complejo Ca-calmodulina interactúa con un sitio en el extremo C-terminal de la Ca^{2+}-ATPasa y produce su activación alostérica. La bomba de calcio también puede ser activada por fosfatidilinositol bisfosfato (PIP_2) y modificación covalente por proteína quinasa dependiente de AMP cíclico. Estos mensajeros modulan así el funcionamiento de la ATPasa.

Se han descubierto cuatro formas moleculares de esta Ca^{2+}-ATPasa (PMCA1 a 4). PMCA1 y 4 se expresan en la mayoría de las células, mientras

que PMCA2 y 3 se encuentran en cerebro, músculo esquelético, hígado y riñón.

Ca^{2+}-ATPasa de retículo sarcoplásmico. Esta ATPasa, conocida como SERCA, constituye un 80% del total de proteínas integrales de la membrana de RS y ocupa más de un tercio de su superficie. Bombea Ca^{2+} desde el citosol hacia el interior de las cisternas del RS, en donde permanece almacenado, para liberarse durante la despolarización celular. La concentración de Ca^{2+} en el citosol juega un papel crítico en los mecanismos de contracción y relajación muscular (pág. 66).

La Ca^{2+}-ATPasa de RS, a diferencia de la PMCA, transporta 2 iones Ca^{2+} por cada molécula de ATP hidrolizada. Su actividad está regulada por fosfolambano y sarcolipina, proteínas de masa molecular pequeña que se encuentran en la membrana del RS.

Como ocurre en el caso de otros transportadores, existen varias formas de la Ca^{2+}-ATPasa de RS. Se han descubierto tres formas. SERCA1 se encuentra en músculo esquelético, mientras que SERCA 2 y 3 se expresan además en corazón.

H^+, K^+-ATPasa

Esta enzima tiene una gran similitud estructural con la Na^+,K^+-ATPasa, posee subunidades α y β. Cataliza el contratransporte de H^+ y K^+ acoplado a la hidrólisis de ATP. A diferencia de la Na^+,K^+-ATPasa, que es electrogénica, la H^+,K^+-ATPasa es electroneutra, expulsa un H^+ hacia el exterior por cada K^+ introducido en la célula. Se encuentra en las células parietales de mucosa gástrica, en donde su acción permite alcanzar elevadas concentraciones de H^+ en la secreción del estómago e incrementar la concentración de K^+ en el citoplasma. Además, está presente en los túbulos colectores del riñón, donde juega un papel importante en el proceso de acidificación de la orina.

ATPasas tipo F

La de mayor interés es la existente en membrana interna de mitocondrias (ver pág. 177). La estructura y el mecanismo de acción de estas ATPasas son diferentes de las de bombas tipo P. Está compuesta por asociación de múltiples subunidades en un complejo proteico (F_1-F_0) con un gran dominio extramembrana (F_1) que contiene el sito catalítico y otro transmembrana que forma el canal de protones (F_0). Funciona como ATP sintasa, impulsada por el flujo de protones. La translocación de protones que ocurre en la membrana interna de mitocondrias durante la transferencia de electrones en la cadena respiratoria (pág. 178) genera un potencial electroquímico utilizado para la síntesis de ATP al retornar los iones H^+ a la matriz mitocondrial.

ATPasas clase V

Representantes de este grupo se encuentran en membranas de lisosomas y endosomas; bombean protones desde el citosol hacia el interior de la organela, cuyo pH es de alrededor de 5,0. Esto significa que la actividad de la ATPasa permite mantener una concentración de H^+ 100 veces mayor en el lado interno de la membrana que en la faz citosólica, donde el pH es próximo a 7. Esto es importante para mantener el medio óptimo para las enzimas (hidrolasas) involucradas en la degradación de proteínas contenidas en lisosomas. Además, esta ATPasa crea el medio ácido en los endosomas que favorece la disociación de ligandos de sus receptores, luego de su internación en la célula.

La estructura y mecanismo de acción de estas ATPasas es similar a las del tipo F. Están constituidas por dos porciones, una citosólica (V_1) que fija ATP y ejerce la acción hidrolítica. La otra, unida a la membrana (V_0), forma el canal para el paso de protones. El sector V_1 está compuesto por ocho subunidades, designadas con letras de la A a la H. Tres subunidades A y tres B se asocian de manera alternada, formando una partícula esférica, la cual se conecta con la porción V_0 por un eje o tallo constituido por las subunidades C, D, E y F. Esto da a la proteína la apariencia de un "hongo" saliendo de la membrana. El segmento V_0 tiene la forma de un anillo, compuesto por seis proteínas (a, d, e, c, c' y c").

La ATPasa V utiliza la energía de la hidrólisis de ATP para producir un cambio conformacional en la molécula, que resulta en un movimiento rotatorio del tallo y el segmento V_0 y en la translocación de los protones desde la cara citoplásmica a la luz endosomal. Su función está regulada por un mecanismo de ensamble y disociación de las subunidades V_1 y V_0, que responde a los niveles citosólicos de glucosa.

También se encuentran ATPasas tipo V en la membrana plasmática de células tubulares del riñón, en donde contribuyen a la secreción de H^+ en orina y en osteoclastos, células tipo macrófagos que actúan en el proceso de resorción del hueso. Aquí la bomba expele protones y acidifica el medio, contribuyendo a disolver los cristales de hidroxiapatita.

Transportadores ABC

Este grupo de transportadores activos constituye una numerosa familia de proteínas caracterizada por poseer un dominio que fija ATP. De allí las siglas ABC, del inglés *ATP binding cassette*. Su principal papel fisiológico es el actuar como transportador de sustancias tanto endógenas como exógenas al organismo, de estructura muy variada. En humanos se han reconocido 48, de los cuales casi la mitad transporta lípidos o compuestos relacionados con lípidos. Utilizan la energía de la hidrólisis de ATP para extraer de la célula carbohidratos, lípidos, péptidos, sales biliares y antibióticos.

Los ejemplos de mayor interés son las proteínas de transporte de múltiples drogas o MRP (del inglés *multidrug resistance protein)* y el regulador fibrosis quística de conductancia de membrana o CFTR (del inglés *cystic fibrosis transmembrane conductance regulador*) y el receptor de sulfonilurea o SUR.

Proteína de transporte de resistencia a múltiples drogas (MRP de *multidrug resistant protein*). En pacientes con tumores malignos se había observado resistencia al tratamiento con diversos fármacos antineoplásicos. Se pudo establecer que la causa de esa resistencia era la expresión exagerada en las células cancerosas de una glicoproteína de 170 kDa, a la cual se denominó P170 o glicoproteína P. Por ser el primer transportador de este tipo descubierto, actualmente se la conoce como MRP1. Tiene una cadena de 1280 aminoácidos con dos dominios iguales de seis hélices transmembrana y un sitio de unión de ATP en el asa citosólica terminal de cada uno. Este transportador utiliza la energía de hidrólisis de ATP para expulsar de la célula compuestos de naturaleza hidrofóbica. También actúa como canal de cloruros. En células malignas, especialmente de origen hepático (hepatomas), esta proteína es la responsable de la resistencia a los quimioterápicos.

Se han descubierto nueve proteínas de transporte de múltiples drogas diferentes. MRP1 se encuentra en casi todas las células, mientras que las otras formas (MRP2 a MRP9) se expresan en hígado, riñón, intestino, órganos en los cuales promueven la excreción de sustancias tóxicas hacia la bilis, orina y heces respectivamente. Además de exportar fármacos de las células, la proteína MRP1 desempeña el papel de transportador de moléculas como glutatión, el leucotrieno cisteinyl LTD4 y otros compuestos derivados de lípidos.

Regulador fibrosis quística de conductancia transmembrana (CFTR). Tiene estructura semejante a la proteína P170, con los 12 segmentos transmembrana, pero a diferencia de otros transportadores ABC, sólo uno de los dos sitios de unión de ATP es hidrolítico. Además, en el asa citoplásmica media presenta sitios de fosforilación sensibles a proteína quinasa A, dependiente de AMP cíclico. El CFTR es un canal de cloruros de membrana apical de células epiteliales de pulmón, glándulas sudoríparas, páncreas y otros tejidos. Es activado por ATP y por AMP cíclico.

Diversas mutaciones en el gen de CFTR pueden inutilizar a esta proteína como transportador de Cl^- y producir una enfermedad letal, la *fibrosis quística*. Es una de las alteraciones genéticas autosómicas recesivas más frecuentes en individuos de raza blanca. La enfermedad se manifiesta por aumento de Na^+ y Cl^- en sudor y espesamiento de secreciones de vías respiratorias, páncreas e intestino que favorece complicaciones infecciosas.

Receptor de sulfonilurea (SUR). A diferencia de otros miembros del grupo ABC, éste no es un transportador por sí mismo, pero se asocia a canales de K^+ para formar una estructura mayor que funciona como un canal de K^+ regulado por ATP (K_{ATP}). Tiene la estructura típica de las proteínas ABC con la adición, en el extremo N-terminal, de una región que atraviesa la membrana cinco veces. Se encuentra en células β del páncreas, en donde es importante para la liberación de insulina. Responde a cambios en los niveles de ATP para regular la salida de K^+, lo que genera cambios del potencial de membrana y la liberación de insulina. SUR es regulado por glucosa y sulfonilurea, sustancia que se utiliza para el tratamiento de diabetes tipo 2.

Transporte activo secundario

Los sistemas de transporte activo como Na^+,K^+-ATPasa y Ca^{2+}-ATPasa son considerados *primarios*, ya que la transferencia de iones se acopla a la hidrólisis de ATP, proveedor inmediato de la energía necesaria.

Existen otros sistemas de transporte activo, llamados *secundarios*, que no utilizan directamente la energía de reacciones exergónicas acopladas, sino la diferencia de potencial electroquímico creada por el funcionamiento de un sistema primario. La bomba de sodio, por ejemplo, genera una notable diferencia de potencial químico y eléctrico (el interior de la célula se hace negativo con respecto al exterior) a favor del cual los iones Na^+ del espacio extracelular tienden a ingresar en el citoplasma. Este ingreso de Na^+ tiene un ΔG negativo y puede impulsar el flujo simultáneo de otros iones o sustancias.

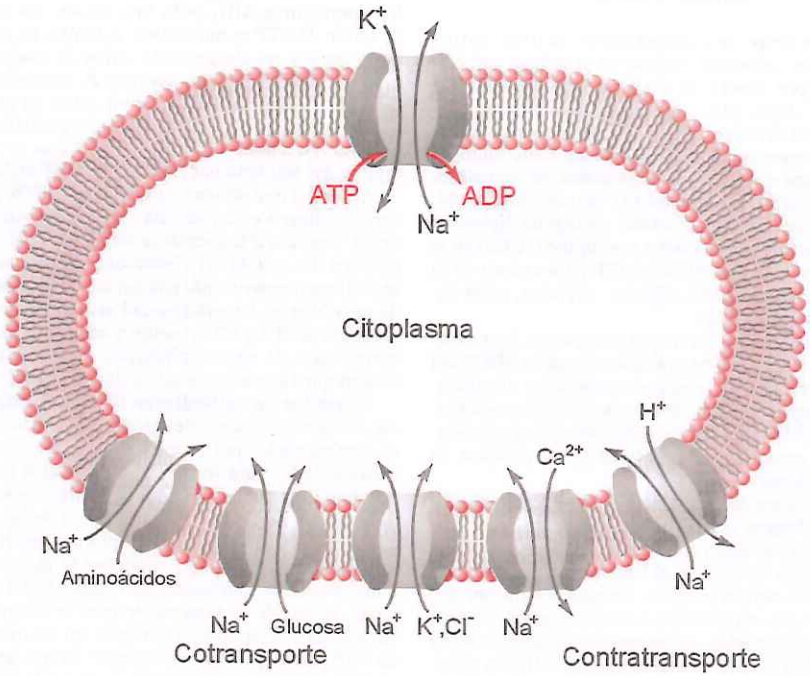


Fig. 11-17. Representación esquemática de un sistema de transporte activo primario (bomba de sodio, arriba) y sistemas de transporte activo secundario [cotransporte activo secundario (Na^+-aminoácidos; Na^+-glucosa; y Na^+-K^+-Cl^-) y contratransporte Na^+-Ca^{2+} y Na^+-H^+, abajo].

Cuando el sentido del flujo de la otra molécula o ion "arrastrado" por el del Na^+ es el mismo que el de éste (desde fuera hacia dentro de la célula), se habla de cotransporte (*symport*); cuando marcha en dirección opuesta, se trata de contratransporte (*antiport*) (fig. 11-17).

Lógicamente, los procesos secundarios son dependientes de la actividad del sistema primario. Por ejemplo, aquellos asociados al gradiente de Na^+ se detienen si la Na^+,K^+-ATPasa no funciona, puesto que se disipa el potencial electroquímico para ese catión a ambos lados de la membrana. Los sistemas de transporte secundario transfieren el soluto de interés acoplándolo al movimiento del Na^+ o de otro catión.

Transportadores secundarios que dependen del gradiente de Na^+. Entre estos se encuentran los siguientes:

Transportador de glucosa dependiente de sodio o SGLT (del inglés, *sodium-dependent glucose transporter*). Es el encargado de mediar el ingreso de glucosa en células de la mucosa intestinal (SGLT1). La glucosa es transportada contra el gradiente de concentración desde la luz intestinal hacia el citosol de las células de la mucosa a través de la membrana apical. Es una glicoproteína compuesta por una cadena de 664 aminoácidos con 14 hélices transmembrana que forman el canal y tienen sitios específicos a los cuales se fijan iones Na^+ y glucosa desde la faz luminal. Esta unión produce un cambio conformacional en la glicoproteína que permite el ingreso de Na^+ y glucosa en la célula. El pasaje de Na^+ a favor del gradiente electroquímico tiene un ΔG negativo suficientemente grande como para impulsar el de glucosa contra su gradiente químico. Por cada glucosa transportada se introducen dos iones Na^+. Una vez dentro de la célula, la glucosa es enviada hacia el espacio intersticial y la sangre por transporte facilitado (portadores GLUT2 de la membrana basolateral).

En células epiteliales de túbulos renales también existen cotransportadores Na^+-glucosa, denominados SGLT2. Está ubicado en la porción inicial de los túbulos proximales del nefrón y

transfiere un ion Na^+ por cada molécula de glucosa. En el segmento final de los túbulos proximales, el portador es el SGLT1, con una estequiometría de dos Na^+ por cada glucosa.

Transportadores de aminoácidos dependiente de sodio. Los aminoácidos se absorben en intestino y túbulos renales por mecanismos de transporte dependientes de Na^+. También existen transportadores de aminoácidos independientes de Na. (ver pág. 332).

Cotransportador $Na^+/K^+/Cl^-$ o NKCC (*Na^+,K^+,Cl^- cotransporter*). Este acopla la entrada de Na^+ al movimiento de K^+ y Cl^- hacia el interior celular. El transporte posee una estequiometría para los iones de $1Na^+$:$1K^+$:$2Cl^-$, de manera que es electroneutro. Una forma de este transportador (NKCC1) se expresa en células epiteliales en general, otro (NKCC2), se encuentra exclusivamente en el asa de Henle del riñón. Los NKCC son proteínas con doce dominios transmembrana y extremos N- y C-terminales intracelulares.

Otra proteína muy semejante en estructura al NKCC es el cotransportador Na^+/Cl^-, que es importante para la reabsorción de Na^+ y Cl^- a través de la membrana apical de las células del túbulo distal del riñón.

Intercambiador Na^+/Ca^{2+} o NCX (*Na^+/Ca^{2+} exchanger*). Es un *antiport* que introduce tres iones Na^+ por cada ion Ca^{2+} expulsado al espacio extracelular, en un proceso electrogénico. Esta proteína de 9 dominios transmembrana se expresa en las células de miocardio y del músculo liso de las arterias. Cumple un papel fundamental en el mantenimiento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} y en la regulación de la contractilidad muscular.

Intercambiador Na^+/H^+ o NHE (*Na^+/H^+ exchanger*). Utiliza el gradiente de Na^+ para intercambiar este ion por protones, que son expulsados de la célula. Funciona con una estequiometría de $1Na^+$:$1H^+$, se encuentra en casi todas las células y en la membrana apical de epitelios como el del túbulo proximal del riñón. Incluye nueve isoformas diferentes con una estructura similar de 12 dominos transmembrana. Es importante en la regulación del pH intracelular y del organismo en general.

Transportadores independientes del gradiente de Na^+. Acoplan el movimiento del soluto que transportan a iones diferentes del Na^+. Entre estos sistemas, se encuentran:

Cotransportador K^+/Cl^-. Utiliza la diferencia de potencial químico para el K^+ que es generado por la bomba de sodio. El gradiente de K^+ favorece su salida de la célula y esto se utiliza para el cotransporte de Cl^-. Ambos iones son eliminados del citosol en una relación de un K^+ por cada Cl^-. Se encuentra en casi todas las células, tiene una estructura similar a los NKCC e interviene en la mantención del equilibrio osmótico y volumen celular.

Intercambiador HCO_3^--Cl^-. Este transportador facilita el paso de iones bicarbonato y cloruro en contratransporte (es un *antiport*) con estequiometría 1 a 1, es decir, por cada ión Cl^- que atraviesa en una dirección, un anión HCO_3^- pasa en sentido opuesto. Como el balance de cargas a ambos lados de la membrana no se modifica, el intercambio es electroneutro. El gradiente de aniones dicta la dirección de transporte; sin embargo, en la mayoría de las células, el Cl^- extracelular se intercambia por HCO_3^- citoplásmico. En eritrocitos en particular, el flujo iónico se invierte según las células se encuentren en capilares sistémicos o pulmonares. Se han descripto tres variantes moleculares de este intercambiador, que se designan AE (del inglés *anion exchanger*). El AE1 se conoce como la proteína *banda 3*, por su movilidad electroforética particular y abunda en membrana de glóbulos rojos. Desempeña un papel importante durante el transporte de CO_2 en sangre. El AE1 también está presente en la membrana basolateral de células intercalares del túbulo colector renal, donde interviene en la reabsorción de HCO_3^- desde el ultrafiltrado glomerular a la sangre. El AE2 se expresa en células epiteliales, principalmente de mucosa gástrica, colon y riñón. AE3 predomina en tejidos excitables como el cerebro, corazón y músculo liso. Los AE contribuyen directamente a movilizar HCO_3^- hacia la sangre, e indirectamente a la secreción de H^+ y al mantenimiento del pH intracelular. El transporte de Cl^- a través de los AE participa también en la regulación del volumen celular.

En cuanto a su estructura, los AE son dímeros de un polipéptido que pose extremos N- y C-terminal orientados hacia el citoplasma y 13 dominios α-hélice transmembrana. Además están glicosilados en los dominios extracelulares 3 y 4.

Transportadores dependientes de H^+. El potencial electromotriz creado en la membrana interna de mitocondrias por el bombeo de protones también es utilizado en procesos de transporte activo secundario. Numerosos transportadores de iones y moléculas con carga en la membrana interna son impulsados por el gradiente de protones. Ejemplos: el piruvato ingresa a la matriz mitocondrial en contratransporte con ion OH^- o cotransporte con H^+. El transportador de dicarboxilatos intercambia malato, succinato y fumarato por P_i y el de tricarboxilatos, citrato e H^+ por malato. El cotransporte H^+/Ca^{2+} introduce calcio en la matriz. Todos tienen estructura semejante, formados por una cadena polipeptídica con tres repeticiones en tándem, cada una de las cuales posee dos hélices transmembrana.

Endocitosis

En las células también penetran macromoléculas y partículas de gran tamaño utilizando mecanismos diferentes de los indicados en las secciones anteriores.

Se emplea el término *endocitosis* para designar los procesos en los cuales la membrana plasmática rodea al material a incorporar, forma una vesícula que lo contiene y lo introduce en la célula. La endocitosis es importante para incorporar nutrientes a la célula, para eliminar material no deseado del espacio intersticial, para detener sistemas de señales activados por factores unidos a la superficie celular y para reciclar componentes de membrana plasmática. La mayor eficiencia de la endocitosis se alcanza cuando determinadas sustancias o ligandos del medio extracelular se fijan selectivamente a proteínas o receptores de la membrana. Este proceso, específico y regulado, que se inicia con la formación del complejo ligando-receptor, se continúa con una serie de etapas tendientes a introducir el ligando en el citoplasma y conducirlo hacia su destino final en la célula.

Se reconocen dos tipos de endocitosis: *fagocitosis* y *pinocitosis*.

Fagocitosis. Ocurre en algunas células especializadas, como macrófagos, leucocitos neutrófilos y monocitos. Partículas de tamaño relativamente grande se fijan a la superficie de la célula, cuya membrana plasmática emite prolongaciones que engloban la partícula y finalmente la encierran en una vesícula intracelular. Este proceso permite la destrucción y eliminación de agentes como bacterias patógenas, levaduras, restos de células muertas, depósitos de grasas en arterias y otras partículas.

El proceso, en general, se inicia con la unión específica del material a eliminar a receptores de membrana que activan sistemas de transmisión de señales hacia el interior celular (ver pág. 486). Al comienzo las prolongaciones de la célula que envuelven a la partícula endocítica se extienden y adoptan la forma de una copa. El crecimiento posterior de estas evaginaciones requiere el ensamble, en la cara interna de la membrana, de fibras de actina, de miosina y la incorporación de nueva membrana, que se agrega en la base de la copa. El proceso avanza guiado por los receptores de membrana, que se unen de manera progresiva a sitios en la partícula fagocítica, en un fenómeno que se ha comparado a un sistema de cremallera o cierre relámpago. Todo requiere de una serie muy organizada de etapas reguladas por numerosos mensajeros intracelulares. La activación de señales intracelulares se desencadena por la formación del complejo ligando-receptor, que estimula el sistema fosfatidil-inositolfosfato y proteína quinasas. Entre los efectores se cuentan GTPasas que inducen la polimerización de actina, contracción de miosina y la formación del fagosoma.

Pinocitosis. Se produce prácticamente en todas las células. Pueden distinguirse varios tipos: *macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina y mediada por caveolina*. Existe también *endocitosis independiente de clatrina o caveolina*.

Macropinocitosis. A semejanza de la fagocitosis, fibras de actina desde el interior de la célula promueven la proyección hacia el exterior de la membrana, que luego se vuelve sobre sí misma formando grandes vesículas (de 0,2 a 10 μm). A diferencia de la fagocitosis, este proceso no depende de la unión de un ligando a su receptor y las vesículas no engloban una partícula determinada; atrapan una porción del líquido que estaba en contacto con la cara externa de la célula. Las moléculas, iones o pequeñas partículas de cualquier tipo dispersas en dicho líquido son introducidas con él en el citoplasma. En algunas células, la macropinocitosis ocurre de manera espontánea; en otras, se da luego de estimulación por factores de crecimiento.

Endocitosis mediada por clatrina o caveolina. A diferencia de la macropinocitosis, es altamente específica. Receptores en la membrana fijan selectivamente determinados ligandos del medio extracelular. La unión reversible del ligando al receptor tiene las características de especificidad y saturabilidad (cinética de Michaelis-Menten) descriptas para los complejos enzima-sustrato y transportador-soluto. A partir de la fijación del ligando al receptor se desencadena una serie de acciones que determina la invaginación de la membrana en la zona donde se encuentra el complejo. Es frecuente que el complejo se desplace en el plano de la membrana hacia una invaginación ya formada, en la cual se reúnen varios complejos. En todos los casos, la invaginación posee una cubierta de proteína en su faz citoplasmática, razón por la cual se la llama invaginación revestida u hoyo revestido (en inglés, *coated pit*). La proteína que reviste la cara interna de los hoyos puede ser *clatrina* o *caveolina*.

Endocitosis mediada por clatrina. Este proceso, observable en todas las células de mamíferos, es esencial para la introducción de algunos nutrientes. Por ejemplo, el colesterol es incorporado juntamente con las partículas de LDL (pág. 295) y el hierro, con las moléculas de transferrina (pág. 649) después de su unión con los receptores respectivos. Además es importante en la regula-

ción del número de receptores, transportadores o canales de iones expuestos en la membrana plasmática, ya que la introducción de éstos en el citoplasma permite reducir rápidamente su cantidad. Este mecanismo es llamado *down regulation* por los autores de habla inglesa.

Este tipo de endocitosis requiere *clatrina* y *proteínas adaptadoras*. La clatrina está constituida por unidades hexaméricas (3 cadenas polipeptídicas pesadas unidas a 3 livianas) llamadas "triskelions", que se asocian en mallas poligonales y componen una red en la cara interna de la invaginación. Entre las proteínas adaptadoras se cuentan complejos heterotetraméricos formados por unidades de *adaptina*. La AP-2 (*de adaptor protein 2*) es la que ha sido caracterizada en mayor detalle; es esencial en la fase de ensamblaje y formación del endosoma. Las proteínas adaptadoras dirigen la producción de la curvatura adecuada para la formación de una depresión de la membrana cubierta interiormente por la malla de clatrina. Se forma así el llamado "hoyo revestido", que va profundizándose y termina por formar una vesícula totalmente cerrada por la membrana plasmática, cubierta por la malla de clatrina y proteínas adaptadoras (figs. 11-18 y 11-19).

Otro participante en la formación de vesículas es una pequeña proteína que fija GTP, la *dinamina*. La dinamina se dispone en anillo alrededor del cuello de la vesícula cuando está ya profundamente invaginada (fig. 11-19). La hidrólisis de GTP a GDP y P_i determina la contracción del anillo, el cierre del cuello y la liberación de la vesícula en el citoplasma.

Una vez internada en la célula, la vesícula con los complejos ligando-receptor incluidos en su membrana pierde el revestimiento de clatrina y puede fusionarse con otras formando *endosomas tempranos*. El interior del endosoma se acidifica progresivamente, hasta llegar a valores de pH ~5,0. En muchos casos, esta acidificación promueve la disociación del complejo, con liberación del ligando.

A veces el endosoma sufre diferenciación en su estructura (CURL de *compartment of uncoupling of receptor and ligand*). Una porción del mismo adopta una conformación tubular, en la cual se concentran los receptores vacíos, insertos en la membrana; el resto de la vesícula contiene los ligandos libres. Las porciones vesicular y tubular de estos compartimientos terminan por separarse. El segmento tubular con los receptores vuelve a la membrana plasmática y se reincorpora a ella en un proceso de reciclado. De este modo los receptores pueden ser utilizados repetidamente por nuevos ligandos. La porción vesicular, con los ligandos libres, constituye el *en-*

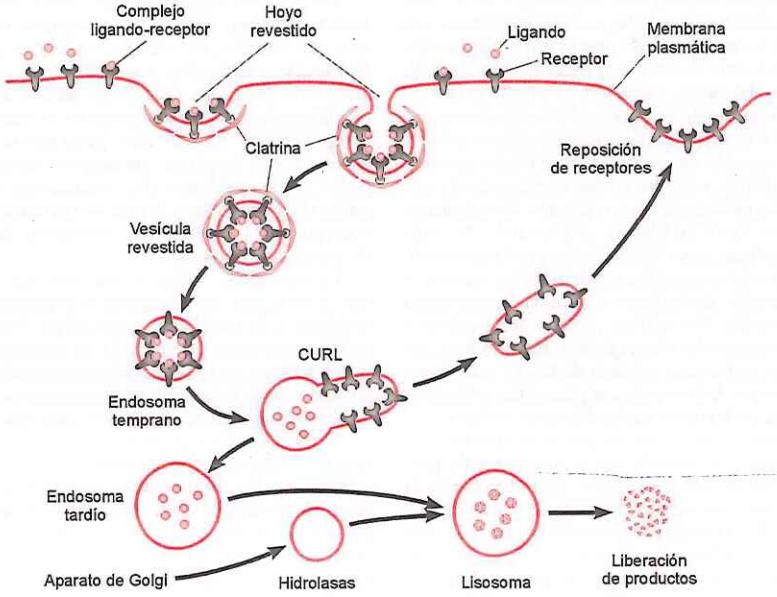


Fig. 11-18. Esquema del mecanismo de endocitosis mediada por receptores.

dosoma tardío, que se fusiona con otra vesícula cargada de enzimas hidrolíticas procedentes del complejo de Golgi para formar un *lisosoma,* en cuyo interior las hidrolasas producen la degradación del ligando.

No todos los ligandos son degradados. Por ejemplo, la transferrina, proteína del plasma que transporta hierro, se une con gran afinidad al receptor de membrana y es englobada en una vesícula revestida. En el endosoma con los complejos transferrina-receptor, cuando el pH desciende de 5,5 se libera el Fe^{3+}, que es transferido al citosol. Los complejos apotransferrina-receptor que quedan en la membrana del endosoma son devueltos a la membrana plasmática, donde la apotransferrina se libera hacia el espacio extracelular y vuelve a la circulación. En otros casos (por ejemplo, factor de crecimiento epidermal) el receptor no retorna a la membrana porque es degradado en el lisosoma junto con el ligando.

Endocitosis mediada por caveolina. En muchas células, especialmente endoteliales, se forman invaginaciones en zonas o microdominios de la membrana plasmática ricos en colesterol y esfingolípidos. Son las denominadas *cavéolas*, cuya organización y estructura dependen de una proteína dimérica llamada *caveolina*.

La caveolina se inserta en la semicapa interna de la membrana, uniéndose a colesterol, y se asocia a otras moléculas de su misma clase para formar una capa de aspecto estriado que termina por revestir completamente la cara citoplasmática de la cavéola. El cierre del cuello y la liberación final de la vesícula son promovidos, aquí también, por *dinamina*.

Este sistema de endocitosis depende en general de una cascada de fosforilación iniciado por proteína quinasas, entre las cuales se encuentra la quinasa Src que fosforila restos tirosina de numerosas proteínas. Entre los blancos de acción de Src están las caveolinas, cuya fosforilación produciría su disociación de la membrana. Además, Src cataliza la incorporación de fosfato a dinamina, lo que causa su activación. Por último, Src fosforila actina y otras proteínas del citoesqueleto. Estos efectos, en conjunto, inducen el proceso de fisión, que separa el endosoma de la membrana plasmática y libera la vesículas endocíticas hacia el interior celular.

La endocitosis mediada por caveolina fue originalmente relacionada con el transporte de proteínas séricas, particularmente albúmina, desde la sangre hasta los tejidos, a través de células endoteliales. Se ha sugerido un posible papel de este tipo de endocitosis en la regulación de sistemas de señalización en cascada, ya que muchas moléculas integrantes de estos sistemas están asociadas a cavéolas. También se cree que participa en el tráfico de colesterol en las células y en la homeostasis general de lípidos.

En los procesos de endocitosis, los trozos de membrana introducidos en la célula con las vesículas representan una sustracción considerable de material de la membrana plasmática. Cuando se reintegra membrana a la superficie, se establece un ciclo que permite la reposición, al menos parcial, de ese material.

La endocitosis es un proceso muy complejo y finamente regulado, en el cual participan gran cantidad de factores. Además de las mencionadas, intervienen otras proteínas accesorias que no enumeramos para no complicar más esta presentación.

Exocitosis

Las proteínas destinadas a *exportación*, encerradas en vesículas formadas por la membrana del sector *trans* del aparato de Golgi, se dirigen hacia la membrana plasmática, se fusionan con ella, se abren hacia el exterior y liberan su contenido. El proceso se conoce con el nombre de *exocitosis*. En células epiteliales, las vesículas de exocitosis pueden ser dirigidas selectivamente hacia la membrana apical o hacia la basolateral, lo cual implica la existencia de algún tipo de señalización.

En muchas células la exocitosis ocurre en forma continua; es la vía de secreción *constitutiva*. En cambio, en células secretoras especializadas para responder a estímulos, el producto elaborado (enzimas digestivas, neurotransmisores, hormonas, etc.) permanece en el citoplasma, "empaquetado" en vesículas, hasta que la llegada de una señal (segundo mensajero, variación de potencial de membrana, etc.) desencadena el mecanismo de adherencia y fusión de membranas y la consiguiente liberación del contenido. Es la vía de secreción *regulada*.

La exocitosis obliga a una continua transferencia de trozos de membrana de organelas intracelulares a la membrana plasmática. Este intercambio, así como el reciclado de membranas de la endocitosis, alcanza magnitudes considerables. Se calcula que la membrana plasmática de las células es totalmente reemplazada cada dos horas.

Exosomas. Un tipo especial de vesículas, llamadas *exosomas*, están siendo estudiadas intensamente en los últimos años por su posible importancia funcional. Son vesículas muy pequeñas (30 a 100 nm) secretadas por las células al medio extracelular. Inicialmente se forman por invaginación de la membrana plasmática y son englobadas en endosomas tardíos, donde aparecen como cuerpos multivesiculares que luego se fu-

sionan con la membrana externa y son liberados al exterior como exosomas. Pueden encontrarse en líquidos corporales, sangre, orina y saliva; contienen lípidos, proteínas y ARNs.

Al parecer, los exosomas desempeñarían diversas funciones, principalmente servir como mensajeros intercelulares, transportando moléculas señalizadoras. Así ejercerían acciones tan diversas como modulación de la respuesta inmune, de procesos tanto regenerativos como degenerativos, proliferación de tumores, etc. En suma, la evidencia acumulada hasta ahora sugiere que los exosomas tendrían muy importantes funciones y un uso promisorio en clínica. Se ha propuesto que el estudio de componentes de exosomas servirían como marcadores pare el diagnóstico y pronóstico de enfermedades y que podrían utilizarse como recurso terapéutico para transferencia de sustancias a las celulas.

Transporte vesicular

Los procesos de endocitosis y exocitosis implican el transporte de material encerrado o inserto en membranas de vesículas formadas por invaginación de la membrana plasmática en el primer caso y de evaginación de la de organelas en el segundo. El transporte vesicular es una actividad celular muy importante en el tráfico de moléculas entre diferentes compartimientos dentro de la célula.

Formación de vesículas. La evaginación de membranas de organelas (también la invaginación de membrana plasmática en la endocitosis) es mediada por proteínas que polimerizan en una malla adosada a la cara citosólica y dirigen la formación de la vesícula. Se han descripto tres clases de proteínas de revestimiento: *clatrina*, *COPI* y *COPII*.

La clatrina cubre las vesículas de membrana plasmática en la endocitosis y las que transportan material desde el aparato de Golgi a los lisosomas. Polimeriza en una red que semeja una canastilla de mallas poligonales.

Las proteínas COP forman complejos llamados *coatómeros* (del inglés *coat*, cubierta) que no se disponen en malla geométrica como la clatrina, sino en una capa densa y difusa. Las vesículas revestidas por COPI emergen del aparato de Golgi y las revestidas por COPII transportan proteínas desde el RE al Golgi.

La clatrina desempeña un papel puramente estructural; contribuye a dar forma a la vesícula. Entre ella y la membrana se disponen otras proteínas accesorias *adaptadoras* (fig. 11-19) cuya función es reconocer el contenido de la vesícula.

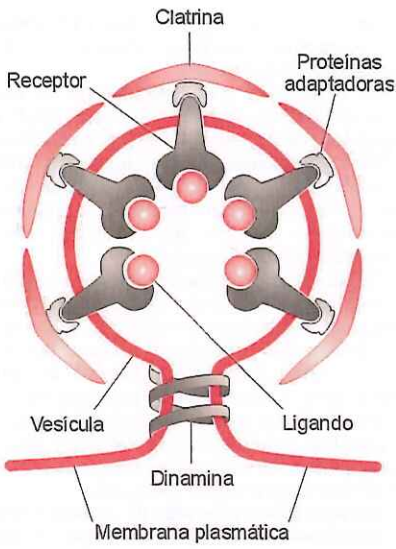


Fig. 11-19. Vesícula revestida por clatrina. La unión de clatrina a la membrana es mediada por proteínas adaptadoras. La dinamina, proteína unida a GTP, se dispone alrededor del cuello de la vesícula en formación; la hidrólisis del GTP provee la energía que permite a la dinamina cerrar el cuello y dejar libre la vesícula.

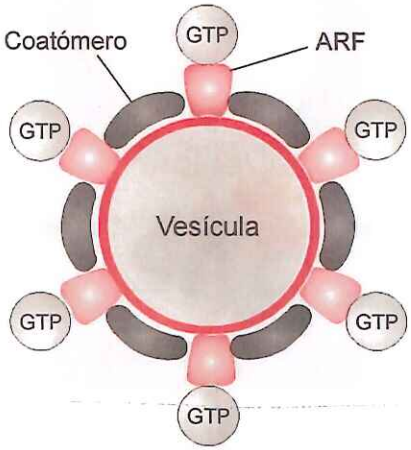


Fig. 11-20. Vesícula revestida por proteína COP (coatómero). El ensamble de COP requiere proteína ARF (factor de ADP-ribosilación) que une GTP.

Existen varias, con especificidad para distintas vías de transporte. En la liberación de la vesícula participa la *dinamina*.

La agrupación y el ensamble de las moléculas de cubierta, tanto clatrina como COP, son regulados por proteínas pequeñas con actividad GTPasa, designadas con las siglas ARF (factor de ADP-ribosilación). Las ARF se unen a GTP (fig. 11-20); cuando lo hidrolizan, la proteína de revestimiento de la membrana se despolimeriza y la vesícula queda "desnuda".

Traslación de vesículas dentro de la célula. Entre el RE y la red *cis* del Golgi, las vesículas se desplazan simplemente por difusión. En otros casos, deben recorrer distancias mayores dentro de la célula (particularmente notable es el transporte axonal desde el cuerpo de las neuronas hacia los terminales sinápticos). Ello requiere la presencia de proteínas motoras, como *quinesina* y *dineína*, que impulsan las vesículas a lo largo de estructuras del citoesqueleto (microtúbulos).

Reconocimiento del sitio de destino y fusión de membranas. La vesícula reconoce con exactitud su lugar de "desembarco" gracias a la interacción de proteínas integrales de su membrana y de la membrana receptora, designadas *SNARE* (v-SNARE en la vesícula y t-SNARE en la membrana "blanco", *target* en inglés; el nombre SNARE proviene de *SNAP receptor*), que presentan estructuras complementarias y se reconocen mutuamente con gran especificidad. Las proteínas SNARE se expresan en todas las células; existen 36 tipos diferentes. En neuronas, la v-SNARE se llama *synaptobrevin* y la t-SNARE *syntaxin*. Las SNARE cumplen la función de juxtaponer y ubicar, muy próximas entre sí, las membranas vesicular y "blanco". A continuación se produce la fusión de ambas membranas, en un proceso que requiere Ca^{2+} y es promovido por otras proteínas que se incorporan al sitio de acoplamiento de las SNARE. Entre ellas está Rab, cuya unión con las SNARE requiere GTP (fig. 11-21). Existen distintas clases de Rab, cada una asociada a un tipo de fusión vesicular específica. Una vez que la vesícula se ha integrado a la membrana receptora, el complejo SNARE se disocia y de esta manera puede ser reutilizado en fusiones posteriores. La disociación está a cargo de otras dos proteínas. Una es NSF (*N-metilmaleimide sensitive factor*), enzima hexamérica con actividad de ATPasa, inhibida por N-metilmaleimida. La segunda es SNAP (*soluble NSF attachment protein*), cuya función es fijarse a las SNARE y favorecer la incorporación de NSF al complejo. La hidrólisis de ATP por NSF provee la energía necesaria para la separación de las SNARE.

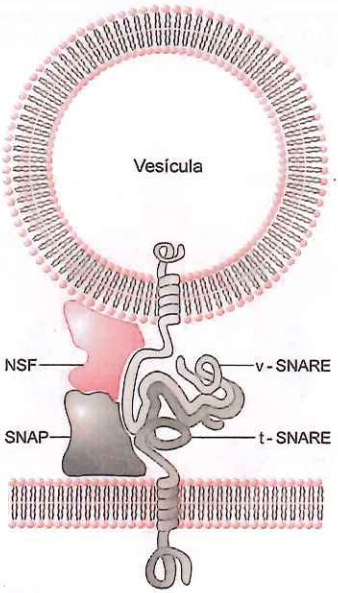


Fig. 11-21. La vesícula reconoce su destino en la membrana "blanco" por la interacción entre el par v-SNARE y t-SNARE. El complejo de ambas. NSF y SNAP promueve la disociación de las SNARE.

Adhesión celular

Las relaciones directas entre células y de éstas con la matriz extracelular dependen en gran parte de la existencia de proteínas integrales de membrana plasmática llamadas *moléculas de adhesión celular* (CAM). Las uniones célula-célula y célula-matriz extracelular son importantes en organismos multicelulares. Algunas de estas interacciones son transitorias, como las de células del sistema inmunitario y las que dirigen los leucocitos hacia los sitios de inflamación. Otras uniones más estables son esenciales para la organización de tejidos y órganos.

Moléculas idénticas en células distintas pueden unirse entre sí en adhesiones *homofílicas*. La interacción de moléculas diferentes en una y otra célula es una adhesión *heterofílica*.

Se han reconocido cuatro grupos principales de CAM: *selectinas*, *integrinas*, *cadherinas* y la *super-familia de inmunoglobulinas* (Ig). Las de los tres primeros grupos son glicoproteínas que requieren Ca^{2+} o Mg^{2+} para cumplir su función. El último grupo presenta en su molécula uno o varios dominios de estructura similar a los de inmunoglobulinas (pág. 664).

Selectinas. Comprenden una familia de tres tipos de lectinas dependientes de Ca^{2+} (L de leucocitos, E de endotelio y P de plaquetas). Todas están constituidas por una cadena polipeptídica que presenta los siguientes dominios a partir del terminal N: 1) porción de unión al ligando, similar a las lectinas vegetales; 2) trozo homólogo al factor de crecimiento epidermal; 3) dos a nueve repeticiones en tándem de módulos semejantes a los de proteínas de unión al complemento (pág. 675); 4) segmento transmembrana, y 5) dominio C-terminal intracitoplásmico.

Los ligandos naturales de selectinas son oligosacáridos con ácido siálico o sulfato en glicoproteínas tipo mucinas.

Las selectinas median la adhesión transitoria y los primeros contactos de leucocitos con el endotelio vascular en la fase inicial de movilización de estas células hacia los sitios de inflamación. Estas adhesiones son transitorias.

Integrinas. Son heterodímeros que resultan de la asociación de proteínas integrales α y β. Se han identificado 18 formas del polipéptido α y 8 formas del β que constituyen 24 dímeros diferentes. Las dos cadenas poseen un gran dominio extracelular, un segmento transmembrana y un pequeño trozo C-terminal intracitoplásmico.

Los ligandos de integrinas son polipéptidos de superficies celulares de la superfamilia de inmunoglobulinas o grandes moléculas de la matriz extracelular, entre ellas *fibronectina* y *laminina*. Por su cara citoplasmática las integrinas se asocian a otro grupo de proteínas, como *vinculina*, que a su vez se une a actina y sirven de nexo entre los sitios de adhesión y el citoesqueleto celular. Esto da rigidez mecánica y estabilidad a los puntos de contacto celular.

Las integrinas participan en interacciones célula-célula, en la fijación de células a la matriz extracelular y en una variedad de funciones adhesivas. Pueden mediar tanto uniones estables como transitorias.

Cadherinas. Son moléculas de adhesión dependientes de Ca^{2+} que intervienen en uniones estables entre células. Forman parte de las uniones adherentes y desmosomas. Son glicoproteínas que presentan un gran dominio extracelular con cinco repeticiones en tándem de un módulo de 100 aminoácidos en las cuales reside la actividad adhesiva y los sitios de unión de iones Ca^{2+}. Poseen una hélice transmembrana y un dominio citoplasmático generalmente conectado con proteínas del citoesqueleto (actina o filamentos intermedios) por intermedio de moléculas de fijación (α y β cateninas). Formas diferentes de cadherina se expresan en distintos tipos celulares, E de epitelo, VE de endotelio y N neuronas y de células del mesénquima. Estas moléculas son esenciales en la formación de tejidos; su expresión disminuida o pérdida en células cancerosas se correlaciona con las características invasoras de un tumor.

Superfamilia de inmunoglobulinas. Existen diversas clases de estas moléculas, expresadas en membranas después de activación por citoquinas (pág. 687). En su mayoría actúan como ligandos de integrinas. Comprenden diversas proteínas, entre ellas las *moléculas de adhesión intracelular* (ICAM), de *células nerviosas* (NCAM), de *células vascu*lares (VCAM) y de *células de mucosas* (*adresinas*).

El descubrimiento de las moléculas de adhesión celular ha contribuido a aclarar aspectos de la respuesta inmunitaria y a comprender el mecanismo de migración de leucocitos a través de las paredes de capilares en la inflamación. Por otra parte, numerosas evidencias señalan su participación en la transformación maligna de células y en el proceso de metástasis de tumores. El conocimiento en este campo abre nuevas perspectivas de aplicaciones terapéuticas.

RESUMEN

Todas las membranas están constituidas por lípidos y proteínas, a las cuales frecuentemente se unen carbohidratos. *Lípidos*. La estructura básica de todas las membranas biológicas es una doble capa lipídica. En ella predominan fosfolípidos; en menor proporción se encuentran glicolípidos y colesterol. La composición de ambas capas no es idéntica (asimetría). En general, fosfatidilcolina y esfingomielina predominan en la capa externa; fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina, en la interna. La fluidez de la membrana es tanto mayor cuanto más elevada es la proporción de ácidos grasos insaturados en los lípidos que la componen. *Proteínas*. Se encuentran en proporción variable para distintas células y organelas. Se distinguen en periféricas e integrales; éstas atraviesan la bicapa una o muchas veces. *Carbohidratos*. Se unen a proteínas y lípidos de la membrana en la cara externa de las células, formando el glicocáliz.

Transporte a través de membranas. *Difusión simple*: sustancias poco polares atraviesan la bicapa. La intensidad del flujo es proporcional al gradiente de concentración; no requiere energía adicional. *Transporte pasivo o difusión facilitada*: como la difusión simple, se realiza a favor del gradiente, sin gasto de energía. Está a cargo de proteínas integrales: portadores y canales, específicos y saturables. Los portadores forman un complejo con el soluto (existen transportadores de un soluto, *uniport*); de dos solutos en el mismo sentido (cotransporte o *symport*), o en sentido opuesto (contratransporte o *antiport*). Ejemplos de transporte facilitado son los transportadores GLUT para glucosa, los UT de urea, los OCT y OAT de cationes y aniones respectivamente. *Canales*: forman poros hidrofílicos en la membrana. Los canales de iones permiten el paso de iones con gran selectividad. Existen diversos tipos, específicos para Na^+, K^+,

Ca^{2+}, Cl^-. Tienen un dispositivo de cierre o compuerta accionado por determinados estímulos. De acuerdo con esto se distinguen canales dependientes de voltaje y dependientes de ligandos. *Ionóforos*: son sustancias que se incorporan a membranas y aumentan la permeabilidad para ciertos iones. *Acuaporinas*: canales de agua. *Transporte activo*: el flujo se hace contra el gradiente; la energía es provista por reacciones exergónicas acopladas al transporte, comúnmente hidrólisis de ATP. Es mediado por transportadores específicos y saturables (cinética de Michaelis-Menten). Se agrupan en varias clases, P, V, F y ABC. *Clase P*: Na^+, K^+-ATPasa o bomba de sodio, las Ca^{2+}-ATPasas o bombas de calcio y la H^+, K^+-ATPasa. *Clase V*: bombas de protones impulsadas por la hidrólisis de ATP. Se encuentran en lisosomas y en la membrana plasmática de algunas células (osteoclastos). *Clase F*: a este tipo pertenece la ATP-sintasa de membrana interna de mitocondrias. Utiliza la energía del flujo de protones a favor del gradiente para sintetizar ATP a partir de ADP y Pi. *Transporte activo secundario*: utiliza la diferencia de potencial electroquímico creado por sistemas primarios como la Na^+, K^+-ATPasa; el cotransporte de glucosa o aminoácidos con Na^+ en la mucosa intestinal y túbulos renales, los intercambiadores Na^+/Ca^{2+}, Na^+/H^+, y HCO_3^-/Cl^- y el cotransportador $Na^+/K^+/Cl^-$ son ejemplos de transporte activo secundario.

Endocitosis (fagocitosis y pinocitosis): el material a incorporar en la célula es rodeado por la membrana plasmática; se forma una vesícula que se interna en el citoplasma. Endocitosis mediada por *clatrina* o *caveolina*: la sustancia se une a un receptor en la superficie externa de la membrana. Esta se invagina, se reviste de clatrina o caveolina en su cara citoplásmica y se desprende como vesícula hacia el citoplasma. La vesícula se une a otras para formar un endosoma temprano cuyo interior se acidifica; en estas condiciones el ligando se separa del receptor. En muchos casos los receptores son reintegrados a la membrana. El resto, con los ligandos libres, es el endosoma tardío que se fusiona con vesículas cargadas de enzimas hidrolíticas procedentes del aparato de Golgi y forma los lisosomas, en los cuales se produce degradación del contenido. *Exocitosis*: dentro de la célula las moléculas son encerradas en vesículas formadas por membrana evaginada de las organelas de origen. Las vesículas se dirigen hacia la membrana plasmática, con la cual se fusionan y liberan su contenido hacia el exterior.

BIBLIOGRAFÍA

Blanco G. (2005). Na,K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation. *Seminars in Nephrology*, 25: 292-303.

Beaugé L. (2000). Distribución de material y mecanismos de transporte pasivo a través de membranas. En: Cingolani H., Houssay A.B. (Eds.). *Fisiología Humana*, 7ma. Ed., El Ateneo, Buenos Aires.

Borst P., Elferink R.O. (2002). Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annual Review of Biochemistry*, 71: 537-592.

Cole S.P.C. (2014). Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1), a "multitasking" ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 289: 30880-30888.

Daleke D.L. (2007). Phospholipid flippases. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 821-825.

Fujiyoshi Y., Mitsuka K., de Groot B.L., Phillippsen A., Grubmüller H., Agre P., Engel A. (2002). Structural function of water channels. *Current Opinion of Structural Biology*, 12: 509-515.

Garrahan P.J. (2000). Transporte activo. En: Cingolani H., Houssay A.B. (Eds.). *Fisiología Humana*, 7ma. Ed., El Ateneo, Buenos Aires.

Gouaux E., MacKinnon R. (2005) Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science*, 310: 1461-1465.

Haas M, Forbush B 3rd. (2000). The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia. *Annual Review of Physiology*.;62:515-34.

Jahn R., Scheller R.H. (2006). SNAREs-engines for membrane fusion. *Nature Review Molecular Cell Biology*, 7: 631-643.

Janmey P.A., Kunnunnen P.K.J. (2006). Biophysical properties of lipids and dynamic. *Trends en Cell Biology*, 16: 538-546.

Linton KJ. (2007). Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda)*, 22:122-30.

Locher KP. (2008). Review. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philosophycal Transactions of the Royal Society, London, B Biology Sciences*, Oct 28.

Malsam J, Kreye S, Söllner TH. (2008). Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65(18):2814-32.

Manolescu AR, Witkowska K, Kinnaird A, Cessford T, Cheeseman C. (2007). Facilitated hexose transporters: new perspectives on form and function. *Physiology (Bethesda)*. Aug;22:234-40.

Pauly BS, Drubin DG. (2007). Clathrin: an amazing multifunctional dreamcoat? *Cell Host Microbe*. 15;2:288-90.

Pedersen PL. (2007). Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*,39(5-6):349-55.

Pokutta S, Weis WI. (2007). Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. *Annual Review of Cellular Development and Biology*, 23:237-61.

Qin J., Xu Q. (2014). Function and application of exosomes. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 71: 537-543.

Riordan J.R. (2008). CFTR function and prospects for therapy. *Annual Review of Biochemistry*. 7:701-26.

Takada Y, Ye X, Simon S.(2007). The integrins. *Genome Biology*, 8:215.

Vlassov A.V., Magdaleno S., Setterquist R., Conrad R. (2012). Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820: 940-948.

Yeagley P.L. (Ed.). (2004). *The Structure of Biological Membranes*, 2da. Ed., CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

CAPÍTULO 12

Digestión. Absorción

De las sustancias ingresadas al tracto digestivo con los alimentos habituales, el agua, sales inorgánicas, la mayoría de las vitaminas, los monosacáridos y unos pocos lípidos son absorbidos sin cambios por la mucosa intestinal. Otros componentes de la dieta deben ser sometidos a un proceso de degradación o *digestión*, durante el cual las moléculas complejas son escindidas en sustancias más simples, que el organismo puede incorporar y utilizar. Esta degradación se cumple mediante reacciones de hidrólisis, catalizadas por enzimas contenidas en los jugos digestivos.

Cuando se alcanza la separación en moléculas sencillas, se procede a su *absorción*. En la mayoría de casos, la absorción no es simple difusión de sustancias a través de membranas celulares permeables, sino el resultado de transporte selectivo.

A continuación se presenta la composición y la acción de secreciones digestivas y aspectos de la absorción de nutrientes en intestino.

SALIVA

Las glándulas salivales principales (parótidas, sublinguales, submaxilares) hacen llegar sus productos a la cavidad bucal a través de conductos de secreción. Existen otras glándulas menores, distribuidas en mucosa bucal y lengua (glándulas de Ebner).

En general, están compuestas por *ácinos* formados por células poligonales que secretan la saliva inicial en la cavidad central de los ácinos. Desde esta cavidad central parten *ductos*, tapizados por células de epitelio columnar, con capacidad para excretar y absorber iones y modificar la composición de la saliva durante su paso por los ductos. Estos desembocan en canalículos que confluyen en el conducto de salida hacia la cavidad bucal.

Es posible obtener saliva de glándula parótida o una mezcla de secreción submaxilar-sublingual utilizando dispositivos especiales de recolección en la desembocadura de los conductos respectivos (*salivas parciales*). La mezcla de estas secreciones parciales se conoce con el nombre de *saliva mixta*. El material obtenido directamente de cavidad bucal es *saliva total*. Está representada por la suma de secreciones parciales de todas las glándulas salivales y otros fluidos, como el excretado por pequeñas glándulas tubulares de mucosa bucal (mucus bucal) y trasudados serosos, como el líquido crevicular gingival. La saliva total está muy contaminada con partículas provenientes del medio bucal (gérmenes, células descamadas del epitelio, leucocitos, restos alimentarios, etc.).

La saliva es un líquido incoloro, viscoso, de pH alrededor de 6,8 y densidad de 1,000 a 1,010. Un adulto normal produce hasta 1 litro de saliva por día. Las salivas parciales son de aspecto límpido; en cambio, la saliva total presenta alguna turbidez debida a las partículas en suspensión.

Composición

Los estudios sobre composición química de salivas parciales (parotídea o submaxilar-sublingual) demuestran pocas diferencias entre estos dos materiales. Las parótidas secretan un líquido más fluido que las submaxilares y sublinguales, cuya saliva es algo más viscosa. Esta viscosidad

se debe al mayor contenido de mucus. La saliva total no es adecuada para su análisis químico, pues si bien está representada en su mayor parte por la suma de secreciones individuales de las glándulas salivales y es fácil de recolectar, contiene aportes de otros fluidos de composición química muy diferente. Por otra parte, aunque las partículas procedentes del medio bucal se eliminan fácilmente por filtración o centrifugación, la composición química de la saliva puede haber sido modificada. Muchos de los componentes químicos de ese material son producidos por bacterias o células no relacionadas con la producción de saliva.

Existen variaciones individuales en la concentración de los principales componentes químicos de saliva, y aun entre muestras de un mismo sujeto recolectadas en diferentes momentos o bajo distintas condiciones (con o sin estimulación, diferente tipo, intensidad y duración de estímulos aplicados, etc.).

La saliva parotídea humana, obtenida sin estimulación, contiene casi 99,5% de agua, 0,24 g por dL de componentes minerales (iones) y 0,26 g por dL de componentes orgánicos.

La composición de la saliva no guarda relación con la del plasma sanguíneo por cuanto se trata de un producto de elaboración activa de las células glandulares. Las concentraciones de iones cloruro y sodio son muy inferiores a las plasmáticas; en cambio, las de iones bicarbonato y potasio son varias veces superiores. La saliva es el jugo digestivo más rico en potasio.

La casi totalidad de sustancias orgánicas son proteínas. Estas representan una mezcla compleja de diferentes componentes. Estudios electroforéticos demuestran no menos de 21 fracciones proteínicas diferentes. Amilasa salival, mucoproteínas e inmunoglobulina A secretoria representan cuantitativamente las proteínas más importantes de la saliva.

Componentes inorgánicos

El fluido secretado por las células acinares tiene composición iónica y molaridad similares a las del plasma sanguíneo. Durante el pasaje por los ductos se produce reabsorción y excreción selectiva de iones; la saliva final posee concentraciones de Na^+ y Cl^- más bajas y de K^+ y bicarbonato (HCO_3^-) más altas que las del plasma.

La secreción y reabsorción de iones están a cargo de sistemas de transporte insertos en membranas *apical* (mira a la luz glandular) y *basolateral* (hacia el espacio intersticial). En ácinos y ductos ocurren procesos diferentes.

Ácinos. El funcionamiento de la bomba de sodio (Na^+,K^+-ATPasa) en la membrana basolateral crea un gradiente electroquímico que impulsa un cotransportador Na^+-Cl^- y un intercambiador Na^+-H^+. Penetran Na^+ y Cl^- y sale H^+. El aumento de la concentración de Cl^- en la célula favorece su paso al lumen por canales de la membrana apical que también permiten salida de HCO_3^-. Además, el Na^+ pasa desde el espacio intersticial al lumen a través de uniones estrechas (*tight junctions*) que separan las células acinares (fig. 12-1). Este Na^+ es acompañado por agua. El K^+ pasa al intersticio y a la luz glandular por canales existentes en ambas membranas. Como resultado de estos procesos, en la cavidad acinar se forma saliva inicial, similar al plasma sanguíneo en concentración de iones y en molaridad.

Ductos. La saliva inicial producida en los ácinos debe recorrer los ductos antes de alcanzar el tubo de salida a la cavidad bucal. En este trayecto se produce reabsorción de Na^+ y excreción de K^+. Ambas actividades son impulsadas por los gradientes creados por la Na^+,K^+-ATPasa de membrana basolateral (fig. 12-2). La membrana apical de células ductales posee intercambiadores Na^+-H^+ y Cl^--HCO_3^-. Los cloruros retornan desde el lumen en contratransporte con HCO_3^- y luego atraviesan la membrana basolateral por canales específicos. La secreción de K^+ hacia el lumen tiene lugar por un intercambiador K^+-H^+.

El egreso de K^+ es repuesto por la entrada del ion desde el espacio intersticial a través de canales. En la membrana basolateral existe un contratransportador Na^+-H^+ que aumenta el pH intracelular e impulsa el intercambio Cl^--HCO_3^- en la membrana apical (fig. 12-2). Las uniones estre-

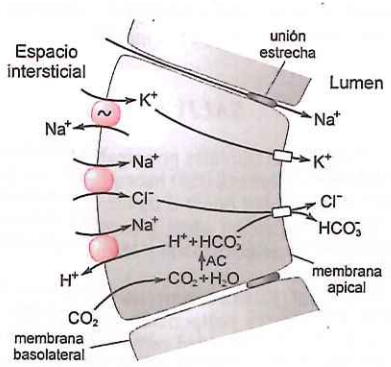


Fig. 12-1. Secreción de iones en células de ácinos salivales. AC: anhidrasa carbónica; ∿: transporte activo; rectángulos blancos: canales de iones.

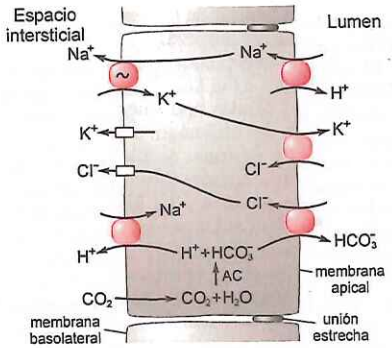


Fig. 12-2. Reabsorción y excreción de iones en células de ductos salivales. AC: anhidrasa carbónica; ∿: transporte activo; rectángulos blancos: canales de iones.

chas de los ductos son menos permeables que los de ácinos, lo cual impide el retorno de H_2O.

Los procesos descriptos explican las diferencias en concentraciones de iones y osmolaridad existentes entre saliva y plasma sanguíneo.

Acción digestiva de la saliva

Las células acinares producen una enzima llamada *ptialina* o *amilasa salival*, que participa en el proceso digestivo iniciando la hidrólisis del almidón presente en los alimentos. Su pH óptimo está alrededor de 7,0 y requiere la presencia de iones Cl^-.

La amilasa salival pertenece a las llamadas α-amilasas o endoamilasas que catalizan la hidrólisis de uniones glucosídicas α-1→4 del interior de la molécula de almidón. En cambio, otras amilasas de origen vegetal son β-amilasas o exoamilasas; promueven hidrólisis del almidón desde los extremos de las cadenas. El almidón está constituido por un componente lineal, amilosa, y otro ramificado, amilopectina. La amilasa salival degrada totalmente la amilosa en maltosas y maltotriosas (trisacárido de glucosas). La hidrólisis libera maltosas y eventualmente quedan maltotriosas al final de la digestión de cadenas con número impar de glucosas. Como la amilasa sólo cataliza la hidrólisis de uniones α-1→4, los productos de la digestión de amilopectina comprenden, además de maltosas y maltotriosas, otros compuestos llamados *dextrinas límite*, oligosacáridos de 5 a 10 residuos que contienen la unión α-1→6 del arranque de una ramificación, sobre la cual la amilasa no tiene acción.

En condiciones normales, la amilasa salival no alcanza a cumplir una degradación tan extensa como la descripta. Debido al escaso tiempo de tránsito bucal, la acción de amilasa se ejerce durante un período muy breve. La enzima continúa actuando en estómago, en el interior del bolo alimenticio, hasta que éste es embebido por jugo gástrico, cuyo pH es muy ácido (alrededor de 1,5). A este pH la ptialina es inactivada, razón por la cual su papel en la digestión de almidón es limitado.

La acción de ptialina es similar a la de amilasa pancreática. Ambas amilasas son isozimas controladas por genes diferentes; presentan gran homología en sus secuencias.

La ausencia de ptialina no produce déficit en la digestión porque la amilasa pancreática tiene capacidad para degradar todo el almidón que llegue a la segunda porción de duodeno.

Otra enzima digestiva de la saliva es la *lipasa*, secretada por las glándulas de Ebner de mucosa lingual. Cataliza la hidrólisis de uniones éster en los triacilglicéridos con ácidos grasos de cadena media o corta en la posición sn-3. Como productos da un ácido graso y 1,2-diacilglicerol. Después de la deglución puede ejercer acción limitada en el estómago ya que es estable a pH bajo. Si bien cumple un papel digestivo de importancia en varias especies, en humanos adultos su acción no es significativa. Puede tener alguna relevancia en lactantes.

Otras funciones de la saliva

La presencia de mucus en saliva le otorga propiedades lubricantes que facilitan la deglución. La saliva tiene también acción protectora; diluye y neutraliza parcialmente ácidos, álcalis y otras sustancias nocivas, y morigera los cambios térmicos.

Ejerce funciones de defensa contra infecciones. Contiene agentes antibacterianos como *lisozima*, con acción hidrolítica sobre componentes de paredes bacterianas, o *lactoferrina*, quelante de Fe, que disminuye la proliferación de microorganismos dependientes de ese metal para su desarrollo.

Las células acinares producen el componente secretorio de inmunoglobulinas A (IgA) y permiten su excreción hacia la luz glandular. Anticuerpos IgA (pág. 667) de saliva contribuyen a la defensa de la mucosa bucal contra virus y bacterias.

En saliva se encuentran también las sustancias determinantes de los grupos sanguíneos ABO.

JUGO GÁSTRICO

El jugo gástrico es producto de secreción de glándulas de la mucosa del estómago. Las más

importantes de esas glándulas son llamadas *principales*, que poseen varios tipos de células con diferente función: a) *parietales* (bordeantes u oxínticas), b) *principales* (zimogénicas o pépticas) y c) *mucosas*. Las glándulas principales se encuentran predominantemente en la mucosa del 80% proximal del estómago (especialmente en el fundus). El 20% distal corresponde a la mucosa pilórica o antro y en ella se encuentran glándulas mucosas y células G, productoras de la hormona *gastrina*.

El estómago humano produce hasta 2 litros de secreción por día, el jugo gástrico, líquido límpido, de color amarillo pálido, compuesto fundamentalmente por agua (casi 99% del total), ácido clorhídrico, enzimas y mucoproteínas (mucina).

Ácido clorhídrico

Es secretado por las células parietales de glándulas principales. Estas células realizan la sorprendente tarea de excretar hacia la luz gástrica una solución de ácido clorhídrico que puede alcanzar una concentración 0,17 M y pH 0,87.

La secreción de un ácido inorgánico fuerte a partir de elementos aportados por soluciones neutras o ligeramente alcalinas como el plasma sanguíneo y líquidos tisulares (pH 7,3-7,4) es un hecho realmente notable desde el punto de vista biológico. Las concentraciones de iones H^+ y Cl^- en jugo gástrico alcanzan valores de hasta 170 mM, mientras en plasma sanguíneo son 0,00004 mM y 105 mM para H^+ y Cl^- respectivamente. La concentración de H^+ es más de un millón de veces mayor en la luz glandular. La energía necesaria para crear este enorme gradiente es provista por ATP, generado en las numerosas mitocondrias existentes en células parietales.

El transporte de protones (o iones hidronio, H_3O^+) es realizado por un sistema de contratransporte activo clase P, la *H^+,K^+-ATPasa* o *"bomba de protones"* (pág. 216).

En estado de reposo, las células parietales muestran numerosos túbulos y vesículas en su citoplasma. Además tienen un canalículo intracelular comunicado con la luz de la glándula (fig. 12-3 A). Cuando la célula es estimulada y se encuentra en plena actividad secretoria, se observa gran disminución del número de vesículas y marcada expansión del canalículo intracelular (fig. 12-3 B).

En células parietales en reposo, la H^+,K^+-ATPasa se encuentra inserta en la membrana de las vesículas intracitoplásmicas, con la faz que libera H^+ dispuesta hacia adentro. La bomba de protones se pone en funcionamiento cuando se le ofrecen iones K^+ desde su "faz ácida". Como no existe K^+ en el interior de las vesículas, la H^+,K^+-ATPasa permanece inactiva.

El estímulo más potente para la activación de células parietales es la *histamina*. Esta sustancia es liberada por células tipo enterocromafín de la región fúndica del estómago, a su vez activadas por la hormona gastrina, acetilcolina y ghrelin. Estos dos últimos agentes estimulan directamente a las células parietales. La histamina se fija a receptores H_2 de membrana basolateral de células parietales e inicia una serie de reacciones en cascada cuyo resultado es la migración de las vesículas hacia la membrana del canalículo intracelular, con la cual se fusionan. Después de la fusión, las ATPasas de las vesículas quedan insertas en la membrana apical, con la faz que libera protones dirigida hacia la luz glandular.

Los iones K^+ presentes en el lumen estimulan la H^+,K^+-ATPasa e inician el intercambio H_3O^+-K^+. El K^+ en la luz gástrica proviene de los alimentos y también del interior de la propia célula. El eflujo de K^+ desde la célula se produce a través de canales específicos en membrana apical. Paralelamente también salen cloruros por canales insertos en la misma membrana. El efecto neto del funcionamiento de la H^+,K^+-ATPasa y del flujo de Cl^- es la secreción de HCl, mientras el K^+ es reciclado dentro y fuera de la célula (fig. 12-4).

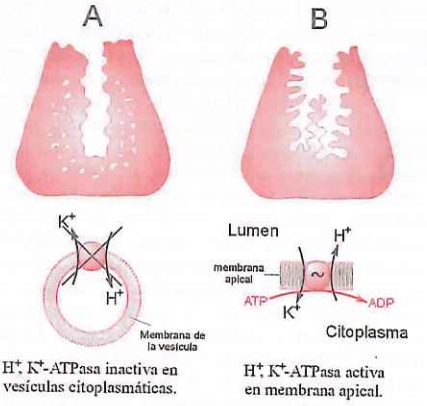


Fig. 12-3. A. Célula parietal de glándulas principales de mucosa gástrica en estado de reposo, no secretante. En la membrana de las vesículas intracitoplasmáticas se encuentran bombas de protones inactivas (esquematizadas en la pare inferior de la figura). **B.** Célula parietal activada. Las vesículas han desaparecido, fusionadas a la membrana apical, el canalículo intracelular se ha expandido. La H^+,K^+-ATPasa, ahora incluida en la membrana apical, expulsa H^+ hacia el lumen e introduce K^+ en la célula.

Cuando el contenido gástrico ha alcanzado un pH suficientemente bajo, las bombas de protones vuelven a ser internadas por endocitosis, se reforman las vesículas, en las cuales permanecen inactivas hasta un nuevo estímulo.

El proceso de secreción ácida plantea interrogantes acerca del origen de los protones en la célula. Este ha sido explicado al demostrarse la abundancia en las células parietales de *anhidrasa carbónica*, enzima que cataliza la ecuación:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

Algunos autores representan la reacción catalizada por anhidrasa carbónica como la combinación de CO_2 con HO^- resultante de la ionización del agua para formar HCO_3^-. El resultado final es el mismo de la ecuación representada arriba.

El CO_2 se origina en los tejidos como resultado de procesos metabólicos y difunde libremente en las células. El ácido carbónico formado se ioniza en iones bicarbonato e hidrógeno.

Los H^+ son captados por la H^+,K^+-ATPasa en forma de iones hidronio (H_3O^+) y transportados hacia la luz gástrica en intercambio por K^+.

El bicarbonato pasa a la sangre por un intercambiador de membrana basolateral que simultáneamente introduce Cl^- a la célula. Por cada protón expulsado hacia el jugo gástrico aparece un HCO_3^- en el plasma sanguíneo. Esto determina el fenómeno llamado "marea alcalina" después de las comidas.

En membrana basolateral existen varios sistemas: intercambiadores HCO_3^-/Cl^-, Na^+/H^+ y "bomba de sodio" Na^+,K^+-ATPasa (fig. 12-4). Su funcionamiento contribuye a mantener las concentraciones iónicas intracelulares.

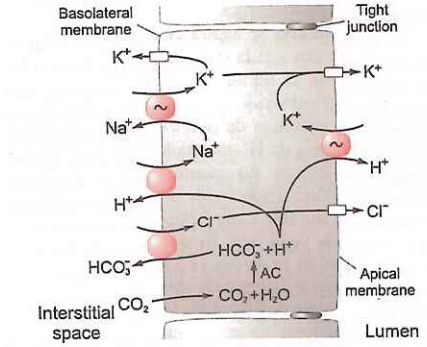


Fig. 12-4. Producción de ácido clorhídrico en células parietales de glándulas principales en membrana apical de mucosa gástrica. AC: anhidrasa carbónica.

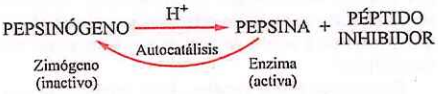
El ácido clorhídrico asegura en jugo gástrico el pH adecuado para la actividad de pepsina. Además tiene acción directa sobre algunos alimentos en los cuales produce cambios que los hacen más fácilmente atacables por enzimas hidrolíticas. También posee acción antiséptica, pues contribuye a impedir el desarrollo de bacterias en estómago, con lo cual evita fermentaciones en el contenido gástrico.

El HCl tiene un papel en el proceso de absorción de hierro. Este elemento se encuentra en algunos alimentos como hidróxido férrico, agrupado en micelas coloidales. El ácido clorhídrico contribuye a formar una solución verdadera por dispersión de iones férricos y los torna más fácilmente reducibles a iones ferrosos. El hierro se absorbe en estado reducido (Fe^{2+}), razón por la cual la presencia de HCl en estómago facilita su absorción en intestino.

Acciones digestivas del jugo gástrico

Pepsina. La principal acción digestiva del jugo gástrico es la hidrólisis parcial de proteínas, a cargo de *pepsina*, enzima secretada por glándulas de la zona corpofúndica al estado de *pepsinógeno*.

El pepsinógeno, de 42,5 kDa, es una proenzima o zimógeno, activado por acción de los iones H^+ existentes en jugo gástrico y también por la misma pepsina. En este último caso, en el cual una enzima promueve la activación de su propio zimógeno, se habla de *autocatálisis*.



El proceso de activación se cumple por hidrólisis de la unión peptídica entre los restos 42 y 43 del zimógeno. Se separa un trozo de 42 aminoácidos del extremo N-terminal y la proteína remanente adquiere plena actividad. La pepsina tiene una masa de 35 kDa.

La secreción de pepsinógeno es estimulada por los mismos factores que activan la de HCl: acetilcolina (neurotransmisor de terminaciones vagales), gastrina e histamina.

Aproximadamente 99% del pepsinógeno producido en glándulas principales es secretado hacia la luz gástrica. El 1% restante pasa al líquido intersticial, es vehiculizado en sangre y llega a riñón, que lo elimina por orina. El pepsinógeno excretado por orina es denominado *uropepsina*; la cantidad guarda relación con la de zimógeno

producido en estómago. En consecuencia, la determinación de uropepsina en orina sirve como índice de actividad péptica del estómago.

Acción de la pepsina. La pepsina ataca prácticamente todas las proteínas, a excepción de queratinas, mucoproteínas y protaminas. Cataliza la hidrólisis de uniones peptídicas alejadas de los extremos de la cadena proteica, esto es, uniones peptídicas situadas en el interior de la molécula. Por este motivo, los productos de hidrólisis son siempre trozos de elevada masa molecular, a los cuales antiguamente se los denominaba proteosas y peptonas.

Las enzimas proteolíticas que, como la pepsina, atacan uniones peptídicas alejadas de los extremos de la cadena, reciben el nombre genérico de *endopeptidasas*.

Si bien la pepsina puede hidrolizar prácticamente cualquier unión peptídica, tiene ciertas preferencias. Ataca selectivamente uniones que comprenden el grupo amina de un aminoácido aromático (triptófano, fenilalanina, tirosina).

El pH óptimo de la pepsina es 1,0 a 2,0, asegurado por la presencia de HCl. Cuando el pH del medio es mayor que 3,0, la acción de la pepsina es prácticamente nula.

En niños de muy corta edad, la acidez gástrica no alcanza los valores habituales del adulto normal. Sin embargo, en los primeros meses de vida, con un pH gástrico próximo a 5,0, suele observarse acción proteolítica en estómago no dependiente de pepsina sino de otras proteinasas, entre ellas *catepsinas*, presentes en lisosomas de casi todas las células y liberadas en la luz gástrica por células descamadas de la mucosa. También se ha descripto en jugo gástrico la existencia de una proteinasa capaz de actuar a pH próximo a la neutralidad.

Fermento lab o renina. Esta enzima proteolítica es secretada en el cuarto estómago de los rumiantes en las primeras etapas de la vida. Produce coagulación de la leche, actuando sobre la proteína más abundante de ésta, la caseína. La renina transforma caseína en paracaseína, la cual, en presencia de iones Ca^{2+}, precipita como paracaseinato de calcio. Esta desnaturalización de la caseína la torna más fácilmente digerible por otras proteasas.

En el ser humano la pepsina cataliza la misma reacción a pH 4,0. Quizás sea la pepsina responsable de coagular la leche en el estómago del lactante.

$$\text{CASEÍNA} \xrightarrow{\text{Renina}} \text{PARACASEÍNA}$$

$$\text{PARACASEÍNA} + Ca^{2+} \longrightarrow \underset{\text{Insoluble (coágulos)}}{\text{PARACASEINATO de Ca}}$$

Lipasa. Es secretada por células del fundus. Su pH óptimo está entre 3 y 6. Cataliza la hidrólisis de uniones éster en las posiciones 1 o 3 de triacilglicéridos, especialmente los que poseen ácidos grasos de cadena corta o media; sus productos son ácidos grasos libres y diacilgliceroles. Junto a la lipasa lingual, que continúa su acción en estómago, contribuye a la degradación de grasas de los alimentos, pero no es esencial. Su ausencia no produce deficiencias porque el páncreas secreta otra lipasa, suficiente por sí sola para atender las necesidades de la digestión. Las lipasas gástrica y lingual adquieren importancia en recién nacidos y lactantes pequeños que aún no han desarrollado su función pancreática.

Mucus. Secretado por células del cuello de glándulas principales y de la superficie del epitelio; está constituido por glicoproteínas. El mucus no es digerido por pepsina y desempeña una función protectora de la mucosa gástrica.

En las glándulas parietales se produce una glicoproteína de masa molecular 55 kDa, llamada *factor intrínseco*, que en estómago forma un complejo con vitamina B_{12} indispensable para la absorción de la vitamina en íleon. B_{12} es factor esencial para la eritropoyesis normal (pág. 602). La falta de factor intrínseco es la causa de la anemia perniciosa.

Análisis de jugo gástrico

En algunos casos clínicos interesa estudiar el volumen, acidez, contenido de enzimas y otros componentes del jugo gástrico.

Existen métodos invasivos y no invasivos. Entre los invasivos se incluyen las pruebas de aspiración de jugo gástrico, mediciones directas del pH gástrico y técnicas endoscópicas.

En las primeras se aspira el contenido estomacal mediante una sonda introducida por boca o fosas nasales. En el líquido obtenido se realiza una titulación con hidróxido de sodio. Los resultados se expresan en términos de *débito ácido*, correspondiente a los mEq de H^+ secretados por hora. En individuos en ayunas, no estimulados, se determina el llamado *débito ácido basal*, con líquido aspirado de estómago durante cuatro períodos consecutivos de 15 minutos cada uno. El débito ácido basal de un adulto normal es de 0 a 11 mEq de H^+ por hora. El *débito ácido máximo* es la misma determinación realizada después de estimular la secreción gástrica mediante inyección de un secretagogo, usualmente pentagastrina. También se ha empleado histamina. El rango en adultos normales va de 10 a 63 mEq de H^+ por hora.

La medición intragástrica de pH no determina la secreción gástrica, sino la acidez gástrica. En general, los métodos invasivos son molestos y requieren mucho tiempo.

Entre los métodos no invasivos se cuentan análisis urinarios, medición de pepsinógeno en suero y de la marea alcalina, técnicas de centelleo con ^{99}Tc y tomografía de impedancia. Estos métodos son, en el mejor de los casos, semicuantitativos y detectan si la secreción de ácido es escasa o ausente.

Alteraciones de la secreción de ácido. La ausencia de ácido clorhídrico en jugo gástrico recibe el nombre de *aclorhidria*. Cuando la concentración de HCl está por debajo de lo normal, se habla de *hipoclorhidria*; si está aumentada, de *hiperclorhidria*, síntoma frecuente en procesos patológicos comunes, como gastritis y úlceras gástrica y duodenal. El conocimiento de los mecanismos responsables de la secreción de HCl en estómago ha permitido desarrollar fármacos efectivos. Primero se introdujeron antagonistas de histamina que bloquean receptores H_2, como *cimetidina*, y posteriormente se utilizaron inhibidores específicos de la H^+,K^+-ATPasa (*omeprazol*). Estos compuestos y antibióticos que erradican la bacteria *Helicobacter pylori*, comúnmente asociada a hiperclorhidrias, son poderosos recursos en el tratamiento de procesos ulcerosos.

JUGO PANCREÁTICO

El jugo pancreático es un líquido similar a la saliva en su aspecto. Contiene pequeña cantidad de proteínas, en su casi totalidad enzimas hidrolíticas, y componentes inorgánicos, principalmente Na^+, K^+, HCO_3^-, Ca^{2+}, HPO_4^{2-}. Su pH es alcalino, de 7,5 a 8,0. Un adulto normal produce hasta 1,5 L de jugo pancreático por día.

El páncreas exocrino está formado por ácinos glandulares cuya luz se continúa con ductos que convergen en canales mayores y éstos drenan en el conducto final.

Componentes inorgánicos

El jugo pancreático es isotónico con el líquido extracelular. La mayor parte del agua y de los iones es secretada por células que tapizan los ductos inmediatos a ácinos. Una característica notable de la secreción de estas células es su elevada concentración de bicarbonato, varias veces superior a la de plasma sanguíneo. La secreción de este ion es estimulada por secretina y potenciada por colecistoquinina y acetilcolina.

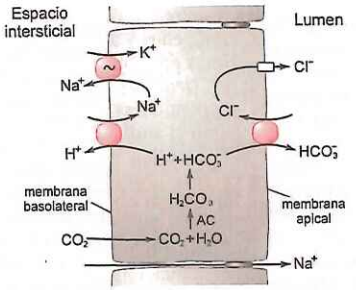


Fig. 12-5. Intercambios iónicos en células de ductos pancreáticos. AC: anhidrasa carbónica.

El transporte de HCO_3^- contra gradiente es un proceso activo secundario, dependiente del funcionamiento de la Na^+,K^+-ATPasa y requiere, además, sistemas intercambiadores HCO_3^--Cl^- en la membrana apical y Na^+-H^+ en la basolateral. El esquema de la figura 12-5 indica los transportadores comprometidos en intercambios iónicos de células ductales.

El bicarbonato se genera a partir de CO_2 producido por el metabolismo de la propia célula y también ingresado desde la sangre y el espacio intersticial. Por acción de anhidrasa carbónica se forman HCO_3^- y H^+. Los protones son transportados hacia la sangre, intercambiados por Na^+ en el sistema de contratransporte Na^+/H^+. Este intercambiador es impulsado por el gradiente de Na^+ creado por la Na^+,K^+-ATPasa. Algunos autores mencionan la existencia de una H^+-ATPasa. Estos mecanismos activos provocan acumulación de HCO_3^- en citosol y secundariamente su expulsión hacia la luz glandular por un intercambiador HCO_3^--Cl^- de membrana apical. La tasa de excreción de HCO_3^- depende de la disponibilidad de Cl^- en el lumen. Los Cl^- son reciclados desde el interior celular gracias a un canal específico. El ion Na^+ se desplaza pasivamente desde el intersticio hacia el lumen a través de uniones estrechas intercelulares (vía paracelular), siguiendo el gradiente electroquímico (fig. 12-5).

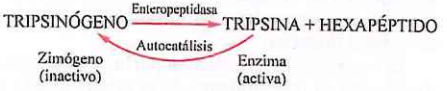
Acciones digestivas de jugo pancreático

El jugo pancreático contiene varias poderosas hidrolasas, sintetizadas por células acinares. La secreción de enzimas es estimulada por factores endocrinos (colecistoquinina, secretina y, mucho más débilmente, gastrina) y neurales (acetilcolina y polipéptido intestinal vasoactivo, VIP). El páncreas produce enzimas que atacan los principales componentes de la dieta (almidón, lípidos y

proteínas). Todas, excepto amilasa y lipasa, son secretadas como zimógenos y activadas en la luz intestinal. Las enzimas proteolíticas comprenden tres endopeptidasas (*tripsina*, *quimotripsina* y *elastasa*) y dos exopeptidasas (*carboxipeptidasas A* y *B*) que separan el aminoácido terminal.

Las endopeptidasas están relacionadas entre sí; son proteasas neutras, inactivadas por pH ácido. Todas tienen un residuo serina esencial en el sitio activo; de allí el nombre genérico de *serina proteasas*. Las carboxipeptidasas A y B también están estructuralmente relacionadas entre sí; ambas son metaloenzimas con Zn.

Tripsina. Es secretada en páncreas al estado de zimógeno o proenzima, el *tripsinógeno*, que se activa en la luz intestinal por acción de una enzima de mucosa intestinal llamada *enteroquinasa* o *enteropeptidasa*. Una vez activada, la tripsina actúa autocatalíticamente sobre el tripsinógeno.



La cadena polipeptídica del tripsinógeno tiene 229 restos aminoacídicos; la de tripsina, 223. La conversión de tripsinógeno en tripsina implica separación de un hexapéptido del extremo N-terminal. Después de la eliminación de este segmento de la molécula el sitio catalítico adopta la disposición espacial adecuada para su actividad. La enzima tiene su pH óptimo entre 8,0 y 8,5.

La tripsina es una endopeptidasa, es decir, cataliza la hidrólisis de proteínas en uniones peptídicas internas. Tiene selectividad por enlaces que contienen el grupo carboxilo de aminoácidos diaminados (lisina y arginina). Sus productos son polipéptidos con aminoácidos básicos en el extremo C-terminal. La tripsina activa todos los zimógenos producidos en el páncreas.

Quimotripsina. Es secretada como *quimotripsinógeno*, preenzima activada en intestino por la tripsina. El quimotripsinógeno es una cadena polipeptídica de 245 residuos. La tripsina cataliza la hidrólisis del enlace entre los restos 15 y 16 y forma β-quimotripsina activa. Esta β-quimotripsina tiene acción autocatalítica; convierte otras moléculas de β-quimotripsina en α-quimotripsina por ruptura de una unión peptídica distante de la hidrolizada por tripsina. Aun cuando la cadena original es seccionada en dos sitios, los tres segmentos resultantes siguen unidos por puentes disulfuros. Las hidrólisis provocan cambios en la estructura tridimensional y promueven la activación de la enzima.

La quimotripsina es también una endopeptidasa. Aunque ataca diversas uniones peptídicas, tiene preferencia por las que comprenden el grupo carboxilo de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptófano).

Elastasa. Cataliza la hidrólisis de la elastina, proteína de fibras elásticas de tejido conjuntivo; también ataca otras proteínas. Promueve la ruptura de enlaces peptídicos adyacentes a aminoácidos de cadena alifática; los péptidos resultantes tienen aminoácidos neutros en su extremo C-terminal. Es secretada como proelastasa y activada por tripsina.

La acción hidrolítica de las tres endopeptidasas sobre proteínas y restos peptídicos generados por la digestión gástrica produce segmentos peptídicos relativamente pequeños.

Carboxipeptidasas. Secretadas como procarboxipeptidasas, se activan por acción de tripsina en la luz intestinal. Son exopeptidasas; catalizan la hidrólisis de uniones peptídicas adyacentes al extremo C-terminal y dejan en libertad el último aminoácido. La carboxipeptidasa A prefiere uniones peptídicas terminales en las cuales el aminoácido final es de cadena neutra. La carboxipeptidasa B ataca péptidos con un aminoácido C-terminal de carácter básico.

Ribonucleasa y desoxirribonucleasa. Actúan sobre ácidos nucleicos; catalizan la hidrólisis de uniones entre nucleótidos.

Amilasa. Tiene poderosa acción hidrolítica sobre almidón. Su actividad es idéntica a la descripta para amilasa salival. Requiere Cl^- y sólo ataca uniones glucosídicas α-1 $\rightarrow$ 4. Los productos finales resultantes de la digestión de almidón por amilasa pancreática son maltosas, dextrinas límite y maltotriosas.

Lipasa. Cataliza la hidrólisis de uniones éster en grasas neutras. Su pH óptimo es alrededor de 8,0 y mantiene actividad hasta pH 3,0. Se desnaturaliza rápidamente debajo de este pH. Los ácinos pancreáticos secretan, junto con la lipasa, un polipéptido de 102 a 107 aminoácidos llamado *procolipasa*. Al llegar a la luz intestinal, la procolipasa es hidrolizada por tripsina y se convierte en un polipéptido de 96 aminoácidos, la *colipasa*, que forma un complejo con lipasa, y sirve como ancla de fijación de la enzima sobre las micelas formadas por ácidos biliares y lípidos de la dieta.

La lipasa sólo ataca enlaces éster en carbonos primarios del glicerol; sus productos, en una primera etapa, son 2,3-diacilglicerol y un ácido graso y en una segunda etapa, 2-monoacilglicerol y otro ácido graso. Es necesaria la acción de una isomerasa que convierte 2-monoacilglicerol en 1-monoacilglicerol (transfiere el ácido graso del alcohol secundario a un carbono primario) para

que la lipasa pueda completar la digestión de triacilglicéridos en glicerol y ácidos grasos libres. La actividad de esta isomerasa no es muy intensa, razón por la cual el proceso de hidrólisis total catalizado por lipasa es lento y sólo una pequeña parte de triacilgliceroles de la dieta son degradados completamente. Una proporción importante termina en 2-monoacilgliceroles.

Colesterolesterasa. Cataliza la hidrólisis de ésteres de colesterol con ácidos grasos. Además actúa sobre ésteres de vitaminas A, D y E y también sobre acilglicéridos. Es activa con sustratos incorporados en micelas de sales biliares. Esta enzima está también presente en células de la mucosa intestinal.

Fosfolipasa A_2. Actúa sobre el enlace entre ácido graso e hidroxilo de carbono 2 del glicerol en glicerofosfolípidos. Se forman un ácido graso libre y lisofosfolípido. Es secretada como proenzima y activada por tripsina. Las sales biliares forman, con fosfolípidos, micelas que se convierten en sustratos de fosfolipasa A_2. La presencia de ácidos biliares es un requerimiento absoluto para la actividad de esta enzima.

MUCOSA INTESTINAL

La mucosa intestinal presenta numerosos pliegues y vellosidades que aumentan notablemente su superficie. Rodeando la base de las vellosidades se encuentran invaginaciones o criptas. Criptas y vellosidades están tapizadas por epitelio columnar formado por *enterocitos* y *células mucosas* (*goblet cells* o células en copa). Ambas se originan a partir de células precursoras ubicadas en el fondo de las criptas y se diferencian a medida que se desplazan desde la cripta hacia el extremo de la vellosidad. Cuando las células maduras llegan a la punta de la vellosidad, descaman a la luz intestinal, donde sufren un proceso de lisis. El tiempo de vida o recambio de estas células es de 3 a 6 días. La membrana apical o luminal de enterocitos presenta *microvellosidades* que amplían enormemente el área de la mucosa. La presencia de microvellosidades da un aspecto característico a la faz apical, del cual deriva su nombre de *borde en cepillo*. Forman parte de este borde en cepillo, como proteínas integrales de membrana, enzimas hidrolíticas y diversos sistemas de transporte.

Enzimas del borde en cepillo

Endopeptidasas. La primera identificada en mucosa intestinal fue la *enteroquinasa* o *enteropeptidasa* (este segundo nombre es más adecuado). Cataliza la hidrólisis de tripsinógeno para formar tripsina, reacción que inicia la serie de activaciones de zimógenos pancreáticos en la luz intestinal.

Existe además una familia de endopeptidasas que actúan sobre oligopéptidos resultantes de la acción de las proteasas pancreáticas. Difieren entre sí en la especificidad por determinadas uniones peptídicas.

Exopeptidasas. Se han descripto al menos seis exooligopeptidasas, con un amplio rango de especificidad de sustrato. Tres de ellas son *aminopeptidasas*; catalizan la ruptura de la unión peptídica adyacente al extremo N-terminal de oligopéptidos, es decir, liberan el primer aminoácido de la cadena. También se encuentran *dipeptidasas*.

Disacaridasas. Son responsables de la degradación final de restos de la digestión de almidón y de los disacáridos presentes en los alimentos ingeridos. Tres de ellas son enzimas bifuncionales, es decir, tienen dos sitios activos diferentes en la misma molécula:

Sacarasa-isomaltasa. Es una glicoproteína integral, con un segmento del extremo N-terminal intracitoplasmático, una hélice transmembrana y el resto, que comprende la mayor parte de la molécula, proyectado hacia la luz intestinal. El sitio activo de isomaltasa está próximo a la membrana y el de sacarasa es distal.

La *isomaltasa* cataliza la hidrólisis de uniones α-1→4 en maltosas y enlaces α-1→6 en dextrinas límite e isomaltosas. La *sacarasa* escinde sacarosa en glucosa y fructosa. Esta enzima era llamada *invertasa*.

Lactasa-florizina hidrolasa. Es otra enzima bifuncional, con su extremo C-terminal dirigido hacia el interior celular. El sitio de *lactasa* cataliza la hidrólisis de lactosa en glucosa y galactosa. El sitio *florizina hidrolasa* produce ruptura de uniones β-glicosídicas (la florizina es un compuesto que posee una unión de ese tipo). Interviene en la digestión de glicolípidos (por ejemplo ceramidas glicosiladas).

Maltasa-glucoamilasa. Es una enzima poco activa. Actúa sobre enlaces glucosídicos α-1→4 y, en muy pequeña escala, uniones α-1→6. Da cuenta de alrededor del 20% del total de maltosa digerida; el 80% restante es hidrolizado por la isomaltasa.

Trehalasa. La mucosa intestinal humana contiene pequeñas cantidades de esta enzima, importante para la digestión de alimentos que contienen trehalosa, como levadura y hongos (la trehalosa es un disacárido no reductor formado por glucosas en unión doble glucosídica α-1→1).

Nucleasas, fosfatasas y nucleosidasas. Degradan ácidos nucleicos y sus unidades componentes. Las *nucleasas* descomponen ácidos nucleicos en nucleótidos. Las fosfatasas, además de nucleótidos, hidrolizan también otros ésteres fosfóricos. Entre las fosfatasas con gran espectro de sustratos se encuentra la *fosfatasa alcalina intestinal*, enzima con zinc, anclada en la membrana del borde en cepillo. Finalmente, las *nucleosidasas* completan la digestión de los nucleósidos resultantes de la acción de fosfatasas; la hidrólisis produce bases púricas o pirimídicas y pentosa.

BILIS

La bilis, producida en hígado en forma continua, se acumula en la vesícula en los períodos interdigestivos. El hígado secreta por día unos 500 a 600 mL de un líquido límpido, de color amarillo dorado o ligeramente pardusco, de aspecto viscoso y sabor fuertemente amargo. Su pH es de 7,8 a 8,6 y su densidad 1,010. La bilis hepática contiene 2,5 a 3,5% de materia sólida.

Composición

La bilis es un líquido complejo; difiere de otras secreciones por su alto contenido relativo de lípidos insolubles en agua (fosfatidilcolina y colesterol) y otros compuestos de propiedades detergentes (ácidos biliares). Contiene además pigmentos biliares, urea, cantidades variables de proteínas, principalmente mucoproteínas, y electrólitos inorgánicos en concentraciones similares a las del plasma sanguíneo.

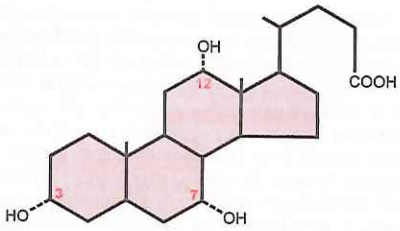
Ácidos biliares. Son compuestos relacionados con el ciclopentanoperhidrofenantreno. Constituyen alrededor del 50% de los solutos orgánicos. Los llamados *ácidos biliares primarios* se sintetizan en hígado a partir de colesterol. Una serie de etapas, iniciadas por una citocromo P_{450} monooxigenasa llamada *7α-hidroxilasa* agrega grupos hidroxilo a la molécula de colesterol, acorta la cadena lateral a 5 carbonos y oxida el C terminal a carboxilo. El más abundante de los ácidos biliares primarios es *ácido cólico* (3α,7α, 12α–trihidroxicolánico) (fig. 12-6). En menor cantidad se encuentra *ácido quenodesoxicólico* (3α,7α-dihidroxicolánico) (fig. 12-7).

Los *ácidos biliares secundarios* se producen en intestino a partir de los primarios por acción de bacterias de la flora entérica. Los principales son *desoxicólico* (3α,12α-dihidroxicolánico) y *litocólico* (3α-monohidroxicolánico).

El grupo carboxilo terminal de ácidos biliares es conjugado en hígado con *glicina* o *taurina*. Se forma una unión amídica y se obtienen ácidos *glicocólico* y *taurocólico* (fig. 12-8). Estos compuestos son más hidrofílicos y más fuertemente ácidos (de menor pK_a) que los ácidos biliares no conjugados. Están disociados dentro de un amplio rango de pH; son neutralizados principalmente por Na^+ y forman *sales biliares*.

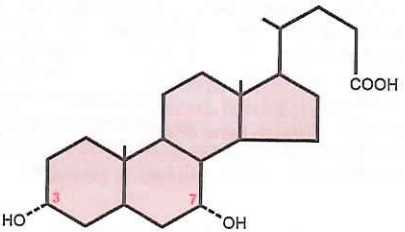
Las sales biliares son compuestos anfipáticos o anfifílicos. Los grupos hidroxilo están ubicados del mismo lado de la molécula (todos en posición α en los ácidos biliares más comunes) y junto con los grupos ionizados (COO^- y SO_3^-) interaccionan con agua. La otra cara del núcleo esteroide es marcadamente hidrófoba. Cuando se alcanza una concentración suficiente (concentración micelar crítica) las sales biliares tienden a agruparse en micelas, en las cuales la faz hidrófila queda hacia el exterior, en contacto con el medio acuoso. Estas micelas engloban otras moléculas anfipáticas como las de fosfolípidos y colesterol; las sales biliares favorecen la emulsión y estabilización de esas sustancias en la bilis.

Durante períodos entre comidas, la bilis secretada por hepatocitos en los canalículos fluye por



Ácido cólico
3,7,12-trihidroxicolánico

Fig. 12-6. Ácido cólico (3,7,12-trihidroxicolánico)



Ácido quenodeoxicólico
3,7-dihidroxicolánico

Fig. 12-7. Ácido quenodesoxicólico (3,7-dihidroxicolánico)

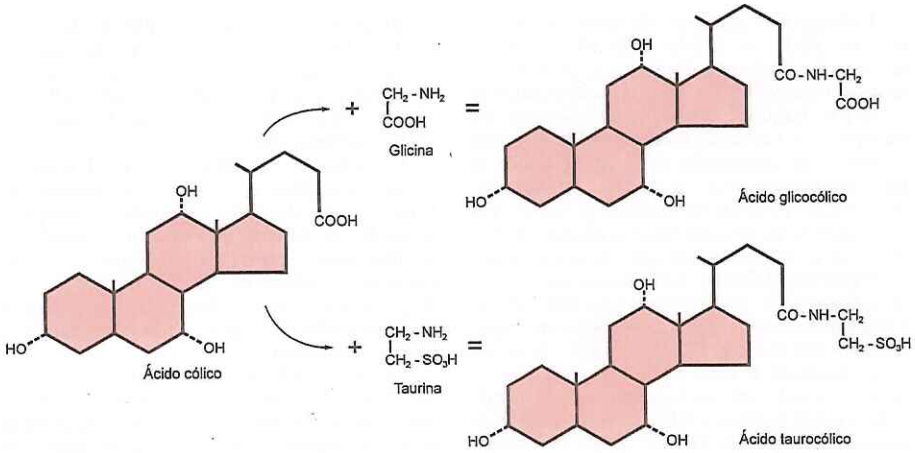


Fig. 12-8. Conjugación de ácido cólico con glicina y taurina.

los conductos y se almacena en vesícula biliar, donde tiene lugar intensa reabsorción de iones inorgánicos, principalmente Na^+, Cl^- y HCO_3^-, y agua, lo cual resulta en ligera acidificación de la bilis vesicular con respecto a la producida en hígado. La concentración de sales y pigmentos biliares en la bilis vesicular alcanza valores 5 a 20 veces mayores que los de la bilis original. Como la actividad osmótica de las micelas formadas por ácidos biliares, fosfolípidos y colesterol es mínima, la bilis vesicular sigue siendo isotónica con respecto al plasma. La bilis almacenada y concentrada en la vesícula tiene color amarillo verdoso y a veces verde oliva. Su pH varía de 6,8 a 7,7 y su densidad alcanza a 1,040. Posee alta proporción de sólidos (hasta 17%).

Al vaciarse el contenido gástrico en duodeno, los componentes de la dieta, principalmente los lípidos, estimulan la liberación de *colecistoquinina* (CCK) por células existentes en mucosa duodenal. La CCK transportada por sangre llega a la vesícula en la cual provoca contracción de su capa muscular. La hormona también relaja el esfínter de Oddi, lo que facilita la evacuación de la bilis hacia el duodeno a través del colédoco.

En intestino, las sales biliares participan en la digestión y absorción de lípidos y sustancias relacionadas. Su acción se ejerce gracias a sus propiedades detergentes, que facilitan la dispersión de los lípidos en finas gotitas, aumentando la superficie para el ataque de enzimas hidrolíticas (lipasa, fosfolipasa, colesterolesterasa); también favorecen la absorción en mucosa intestinal.

Cumplida su misión, las sales biliares continúan su recorrido por intestino delgado, sufren la acción de bacterias de la flora entérica (se forman ácidos biliares secundarios a partir de los primarios), son reabsorbidos por mucosa del íleo distal y enviados de vuelta al hígado por la vena porta. Estos ácidos biliares captados por hepatocitos son reexcretados en la bilis y retornan al intestino. Normalmente la bilis contiene ácidos biliares primarios y secundarios (cólico, quenodesoxicólico y desoxicólico y, en menor cantidad, litocólico) conjugados con glicina o taurina. La llamada *circulación enterohepática* permite reciclar las sales biliares. La cantidad total de estas sales en el organismo es de 2 a 3 g. En el intestino entran y salen de 20 a 30 g por día, lo cual indica que cada molécula recorre el ciclo unas diez veces. Normalmente se eliminan con las heces 0,5 g de sales biliares por día. La síntesis en hígado es regulada para reponer esta pérdida.

Las sales biliares tienen acción *colerética*, es decir, las sales reabsorbidas de intestino por vía porta, estimulan la producción de bilis en hígado.

Fosfolípidos. Los compuestos orgánicos que siguen en abundancia a las sales biliares son fosfolípidos (22% del total de sólidos), en su mayor parte fosfatidilcolinas (lecitinas). Estas moléculas son anfipáticas y se asocian con sales biliares en las micelas. Cada mol de sales "solubiliza" aproximadamente dos moles de fosfolípidos. La asociación de sales biliares y fosfolípidos tiene mayor capacidad que las sales biliares solas para emulsionar otros lípidos, principalmente colesterol.

Colesterol. Constituye alrededor del 4% del total de sólidos en la bilis. Sólo 10% a 15% se encuentra esterificado, el resto está predominantemente no esterificado. En presencia de sales biliares y fosfolípidos, los ésteres de colesterol son incorporados a micelas; la capacidad de mantener colesterol en suspensión en la bilis depende de las proporciones relativas de sales biliares, fosfatidilcolina y colesterol. Desde el punto de vista del metabolismo del colesterol es importante destacar que la bilis es la principal vía de excreción.

Pigmentos biliares. Estas sustancias resultan de la degradación del hemo (ver pág. 362). El más abundante es la *bilirrubina*, conjugada como diglucurónido hidrosoluble. El color amarillo de la bilis recién secretada se debe a este pigmento. Por exposición al aire, o aún en la misma vesícula, la bilirrubina puede oxidarse a *biliverdina*, de color verde intenso. Normalmente la bilis vertida al intestino suele tener una pequeña proporción de biliverdina.

Los pigmentos biliares se consideran productos de excreción y no tienen función digestiva conocida.

Cálculos. La estabilidad de los componentes lipídicos de la bilis es asegurada por una relación adecuada entre concentraciones de sales biliares, fosfolípidos y colesterol. Cuando hay un exceso relativo de colesterol, puede precipitar.

La precipitación de algunos componentes de la bilis en masas sólidas de diverso tamaño y forma (*cálculos*) dentro de las vías biliares es un problema de observación frecuente en clínica. Es común el hallazgo de cálculos en la vesícula y vías biliares; cuando son únicos generalmente tienen forma ovoide, pero cuando son múltiples presentan facetas formadas por presión o rozamiento de unos contra otros. Una sección transversal de los cálculos muestra un núcleo central alrededor del cual se depositan capas concéntricas del material precipitado.

Según la sustancia predominante en su composición, se distinguen cálculos de colesterol (suelen contener de 90 a 98% de esta sustancia), de pigmentos biliares, o de carbonato de calcio.

RESUMEN DEL PROCESO DIGESTIVO

Hidratos de carbono

Aproximadamente 50% de la energía provista por los alimentos de una dieta normal corresponde a carbohidratos. Estos incluyen polisacáridos, disacáridos (principalmente sacarosa y lactosa) y los monosacáridos glucosa, fructosa y galactosa.

El almidón es el principal hidrato de carbono de la dieta. Está presente en muchos alimentos de origen vegetal, como granos, harinas, tubérculos, legumbres, etc. En todos ellos, el almidón se encuentra en sus dos formas, amilosa y amilopectina.

La sacarosa es habitualmente el disacárido más abundante en la dieta. Se encuentra en frutas y otros alimentos vegetales; el compuesto purificado de caña de azúcar o remolacha es el edulcorante de uso más difundido. La ingesta diaria de un adulto es, término medio, de unos 40 g. La lactosa es otro disacárido importante en la alimentación. Su ingesta varía según la edad y hábitos alimentarios.

Los monosacáridos más comunes son glucosa y fructosa, presentes al estado libre en frutas, miel y otros alimentos. El consumo de fructosa se ha incrementado en las últimas décadas; este monosacárido, el más dulce de los azúcares, es utilizado en la preparación de golosinas y bebidas carbonatadas.

Almidón. En la boca comienza la hidrólisis de polisacáridos como almidón y glucógeno, catalizada por *ptialina* o *amilasa salival*. El papel de esta enzima no es importante pues actúa durante un lapso muy breve. Una vez que el bolo alimenticio pasa al estómago, el pH del jugo gástrico la inactiva.

La digestión de almidón se realiza fundamentalmente en intestino por acción de la *amilasa pancreática*, con propiedades catalíticas idénticas a las de la salival. Estas enzimas son endoamilasas; catalizan la hidrólisis de uniones glucosídicas en el interior de la molécula, tanto en la amilosa como en la amilopectina. No pueden escindir enlaces α-1$\rightarrow$4 en extremos de la molécula, ni enlaces α-1$\rightarrow$6 o α-1$\rightarrow$4 próximos a la unión α-1$\rightarrow$6 del arranque de ramificaciones en la amilopectina. Los productos finales de su acción son maltosas, maltotriosas y dextrinas límite, las cuales son hidrolizadas hasta glucosas libres por acción de enzimas del borde en cepillo de mucosa intestinal, la porción isomaltasa del complejo sacarasa-isomaltasa y las dos enzimas de la *maltasa-glucoamilasa*.

Sin embargo, no todo el almidón ingresado con los alimentos es digerido completamente. Una parte, llamada *almidón resistente*, puede escapar a la hidrólisis. En algunos alimentos (bananas inmaduras y vegetales crudos) los granos de almidón suelen adoptar disposiciones organizadas (seudocristalinas) que dificultan el ataque de la amilasa. En granos enteros o insuficientemente triturados y en algunas legumbres, el almidón está físicamente protegido por membranas no di-

geribles que impiden la acción de hidrolasas. El almidón resistente, cuya proporción varía según el tipo de alimento ingerido y el proceso culinario al cual ha sido sometido (la cocción modifica el estado del almidón y lo torna accesible a enzimas), llega incompletamente degradado hasta el colon. Se estima que del 2 al 5% del total de almidón ingerido escapa a la digestión.

Fibra dietaria. El ser humano no puede digerir celulosa, polisacárido abundante en alimentos vegetales, pues no posee enzimas con acción hidrolítica sobre enlaces β-1→4 entre glucosas. Muchos animales, entre ellos los rumiantes, tienen capacidad para digerir celulosa y degradarla hasta productos absorbibles. Esta acción no se debe a enzimas digestivas propias, sino a las de bacterias de la flora del rumen. Es un ejemplo de simbiosis que permite al organismo hospedador aprovechar una importante fuente de nutrientes. En el ser humano se produce también fermentación bacteriana de polisacáridos no digeribles, pero en mucho menor proporción.

La celulosa y otros polisacáridos de alimentos vegetales (hemicelulosa, pectinas y gomas), y la lignina (no es un polisacárido), forman la llamada *fibra dietaria*. Estos compuestos recorren todo el intestino delgado sin sufrir modificación por falta de enzimas capaces de degradarlos.

Se define como *fibra dietaria* a todos los polisacáridos vegetales y lignina resistentes a la hidrólisis de las enzimas digestivas de humanos. La fibra dietaria soluble incluye a las pectinas, gomas y mucílagos y la insoluble a celulosa y hemicelulosa (ver pág. 88). Se considera también fibra dietaria al almidón resistente. Se llama *fibra funcional* a carbohidratos no digeribles extraídos y aislados de sus fuentes naturales o sintetizados; su ingestión tiene efectos favorables para el ser humano.

La hemicelulosa predomina en granos y la celulosa es la fibra principal en legumbres. El conjunto de polímeros indigeribles da volumen al contenido intestinal y es un factor importante de estímulo para la actividad peristáltica. Las pectinas, gomas y mucílagos pueden ser metabolizadas por bacterias del colon y no contribuyen a aumentar el volumen fecal.

En intestino grueso parte de la fibra dietaria, especialmente las pectinas, es fermentada por bacterias de la flora normal y se generan ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico y butírico) y gases (hidrógeno y metano). Los ácidos grasos son utilizados como fuente energética por células de la mucosa (colonocitos) y son también absorbidos y enviados al hígado por vena porta. La celulosa, la hemicelulosa y la lignina son muy pobremente fermentadas por la flora intestinal. El resto de fibra no modificada se elimina con las heces y contribuye a aumentar la masa de materias fecales.

Las condiciones de acidez del medio creadas por la fermentación bacteriana se consideran favorables. Se ha postulado que tendría un rol preventivo del cáncer de colon. También se ha señalado que la fibra fija lípidos y reduce la absorción de grasas y colesterol. Las propiedades señaladas son en general beneficiosas y hacen de la fibra un componente importante de la dieta humana.

Disacáridos. El 100% de sacarosa ingerida es desdoblada por *sacarasa* (integrante del complejo sacarasa-isomaltasa) del borde en cepillo para dar glucosa y fructosa. Toda la lactosa de los alimentos es hidrolizada en galactosa y glucosa por la porción *lactasa* de lactasa-florizina hidrolasa de mucosa.

La actividad de lactasa es elevada en lactantes y va declinando en el transcurso de la vida. En adultos, especialmente de origen asiático y africano, es común que desaparezca o caiga a niveles muy bajos. Sin embargo, algunas personas mantienen actividad de lactasa intestinal durante toda la vida. Este es un rasgo genético conocido como *persistencia de lactasa*. La ausencia o deficiencia de lactasa desde el nacimiento (*intolerancia a la lactosa)* es una condición hereditaria bastante rara; las personas afectadas no toleran la leche o derivados que contengan lactosa. La incapacidad para hidrolizar este disacárido determina su acumulación en intestino y causa una serie de problemas, a veces graves. Por simple efecto osmótico, la lactosa no digerida atrae agua hacia la luz del tubo digestivo. Además, las bacterias de la flora la degradan por procesos fermentativos; se generan compuestos con acción irritativa sobre la mucosa, lo cual produce enteritis, flatulencia y diarrea. El tratamiento consiste en suprimir todo alimento con lactosa, o suministrar leche cuya lactosa haya sido previamente hidrolizada; ésta no ocasiona trastornos pues la absorción y utilización de galactosa y glucosa no están afectadas en absoluto.

El resultado final de la digestión de carbohidratos, abundantes en los alimentos habituales, es la producción de monosacáridos, únicos glúcidos absorbidos y utilizados por el organismo.

Lípidos

Los lípidos de la dieta incluyen triacilglicéridos, fosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol y vitaminas liposolubles (A, D, E y K). Los más abundantes en alimentos comunes son triacilgli-

ceroles con ácidos grasos de cadena larga (mayor de 14 carbonos). La digestión de estos nutrientes insolubles en agua es favorecida por la presencia de sales biliares, las cuales promueven su incorporación en pequeñísimas micelas que se mantienen en suspensión en el medio acuoso del contenido intestinal y ofrecen una gran superficie al ataque de las enzimas hidrolíticas.

Triacilgliceroles. La lipasa salival, secretada por glándulas linguales, tiene una acción insignificante en el ser humano. El proceso de degradación de triacilgliceroles comienza en estómago, catalizado por *lipasa gástrica*. La enzima no es afectada por la actividad proteolítica de pepsina, ni por la acidez del contenido gástrico. Ataca uniones éster de ácidos grasos en los carbonos primarios del glicerol; sus productos son ácidos grasos libres, 1,2-diacilgliceroles y 2-monoacilgliceroles. Su actividad es responsable de la digestión del 10 al 30% del total de grasas neutras contenidas en la dieta. Sin embargo, su presencia no es esencial. En pacientes a quienes se ha extirpado el estómago, no se observan deficiencias en la digestión de grasas. La lipasa gástrica es importante en el niño durante los primeros meses de vida, cuando los niveles de lipasa pancreática son bajos.

La leche materna contiene una lipasa que difiere de la gástrica y la pancreática por su capacidad de hidrolizar cualquiera de las tres uniones éster de triacilglicéridos. Esta lipasa desempeña un papel importante en la digestión de grasas en el recién nacido.

Cuando el contenido gástrico pasa al duodeno, se encuentra con las sales biliares, que favorecen la emulsión de los lípidos. Las sales biliares forman una capa alrededor de las moléculas hidrófobas y, gracias a su capacidad de reducir la tensión superficial en la interfase agua-lípido, permiten la dispersión de las grasas en finísimas partículas y su estabilización en el medio acuoso. La presencia de otras moléculas anfipáticas, como fosfolípidos, coadyuvan en la formación de micelas con grasas apolares en su interior.

Si bien las sales biliares favorecen la emulsión de lípidos, la capa que forman en la superficie de las micelas dificulta la acción de la lipasa pancreática. Este problema es resuelto por la presencia de colipasa; al fijarse a la superficie de la micela, la colipasa desplaza a las sales biliares, permite la unión de *lipasa pancreática* y su interacción con triacilgliceroles.

Los productos finales de la digestión de grasas son ácidos grasos libres y 2-monoacilgliceroles. Se liberan sólo muy pequeñas cantidades de glicerol.

Fosfolípidos. Las micelas formadas por sales biliares y fosfolípidos constituyen buen sustrato para la *fosfolipasa* A_2, que cataliza la hidrólisis de la función éster en posición 2, para dar lisofosfolípido y ácido graso libre. La acción enzimática requiere la presencia de sales biliares. Otras esterasas y fosfatasas completan la degradación del lisofosfolípido.

Ésteres de colesterol. Son escindidos en colesterol y ácido graso por *colesterol esterasa*. Esta enzima también hidroliza las tres funciones éster de triacilgliceroles y ésteres de vitaminas A, D y E. Por esta razón es llamada *esterasa no específica*. Su actividad requiere la presencia de sales biliares.

Proteínas

La digestión de proteínas depende del tipo de proteína y del procesamiento sufrido por el alimento antes de su ingestión. En general, las proteínas vegetales son menos digeribles que las de origen animal. Las ricas en prolina, como gluten y caseína, son relativamente resistentes a la digestión. La cocción desnaturaliza las proteínas y las hace más accesibles a las hidrolasas.

Además de las proteínas de la dieta (la ingestión aconsejada es de unos 70 g por día para un adulto) en el tracto digestivo se vierten proteínas endógenas. Entre 20 y 30 g proceden de las secreciones digestivas (salival, gástrica, pancreática, biliar e intestinal) y otros 30 g de los enterocitos descamados en la luz intestinal.

En la saliva no existen enzimas proteolíticas con acción digestiva significativa. La hidrólisis de proteínas se inicia en estómago. El HCl del jugo gástrico contribuye a desnaturalizar las proteínas de los alimentos y a hacerlas más accesibles al ataque de las proteasas. La *pepsina*, una endopeptidasa, escinde las proteínas en segmentos de elevada masa molecular. Estos polipéptidos pasan al duodeno, donde se encuentran tres potentes endopeptidasas: *tripsina*, *quimotripsina* y *elastasa* de jugo pancreático, cuya acción los reduce a trozos moleculares menores. Hasta aquí no se han producido aminoácidos libres en cantidades apreciables; éstos aparecen gracias a exopeptidasas que atacan los polipéptidos desde sus extremos. *Carboxipeptidasas* pancreáticas separan el aminoácido del extremo C-terminal y *aminopeptidasas* intestinales liberan el aminoácido N-terminal. Dos *dipeptidasas* del borde en cepillo catalizan la hidrólisis de dipéptidos. Los productos finales de la digestión de proteínas son aminoácidos libres, di- y tripéptidos.

Ácidos nucleicos

Nucleasas (ribo- y desoxirribonucleasa) pancreáticas e intestinales separan ácidos nucleicos en los nucleótidos constituyentes. Estos sufren la acción de *fosfatasas* intestinales; se liberan restos fosfato y nucleósidos, los cuales pueden ser absorbidos como tales, o degradados por *nucleosidasas* intestinales. Como productos finales quedan purinas, pirimidinas, ribosa y desoxirribosa.

ABSORCIÓN

Completado el proceso de digestión, los nutrientes siguen el camino de su incorporación al organismo. Aproximadamente 90% del material nutritivo ingresa por intestino delgado. Los materiales absorbidos pueden seguir dos vías de transporte: a) sanguínea, las venas del sistema porta los llevan al hígado; b) linfática, desde los vasos linfáticos del área intestinal al conducto torácico, y finalmente a la circulación general.

Los enterocitos tienen un papel importante como reguladores del paso de sustancias desde el lumen hacia la sangre o linfa. Si bien la membrana apical de estas células es el principal sitio de control y selección de productos ingresados, no es la única barrera a sortear. Desde la luz intestinal hasta la circulación se encuentran: a) una capa delgada de líquido, adosada a la faz luminal de la membrana apical, no perturbada por los movimientos del contenido intestinal. Las sustancias a absorber deben primero difundir a través de esta película acuosa; b) el glicocáliz o cubierta de oligosacáridos de superficie de las microvellosidades; c) la membrana apical; d) el citoplasma; e) la membrana basolateral; f) el espacio intersticial; g) la lámina basal; h) la pared de capilares sanguíneos o linfáticos. El pasaje de nutrientes a través de estas estructuras comprende procesos de difusión pasiva, difusión facilitada y transporte activo.

Las uniones estrechas entre enterocitos vecinos generalmente representan un cierre efectivo que impide el libre intercambio entre el lumen y el intersticio. No obstante, ocasionalmente presentan cierta permeabilidad y permiten un flujo limitado de solutos y agua (vía paracelular).

Hidratos de carbono

Los únicos carbohidratos que pueden ser absorbidos por las células de la mucosa intestinal son los monosacáridos. Los más abundantes azúcares simples liberados por la digestión de

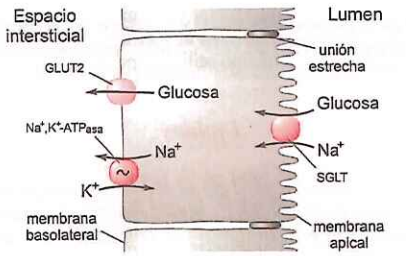


Fig. 12-9. Representación esquemática del proceso de absorción de glucosa en células de la mucosa intestinal.

alimentos en el intestino son la glucosa, la fructosa y la galactosa. Esos compuestos, altamente hidrófilos, son excluidos por la bicapa lipídica de membrana, razón por la cual su ingreso a las células por difusión pasiva es insignificante.

La *glucosa* y la *galactosa* comparten el mismo sistema de transporte en la membrana del borde en cepillo. Este sistema es el SGLT1, una proteína transmembrana de 664 aminoácidos y 14 o 15 hélices que funciona como un transportador activo secundario dependiente de Na^+ (pág. 218). El sistema es impulsado por el gradiente de Na^+ creado por la Na^+,K^+-ATPasa situada en la membrana basolateral de enterocitos. SGTL1 cotransporta glucosa (o galactosa) y Na^+ desde el lumen hacia el interior de las células de la mucosa; la glucosa y galactosa no pueden unirse al transportador si éste no ha fijado previamente Na^+. La estequiometría es de dos iones Na^+ por cada molécula de monosacárido. Gracias a este sistema, la glucosa penetra en la célula contra gradiente. El sodio cotransportado es de inmediato bombeado hacia el espacio intersticial por Na^+,K^+-ATPasa (fig. 12-9). El SGTL1 tiene tal importancia funcional que su ausencia o deficiencia grave es una condición letal.

Cuando el azúcar ha alcanzado concentración más elevada en el citosol de enterocitos que en el espacio intersticial, pasa a éste utilizando el sistema de transporte facilitado GLUT2 (págs. 207 y 256) inserto en la membrana basolateral. Una pequeña porción es utilizada por la misma célula de la mucosa para sus necesidades y la mayor parte difunde hacia la circulación. Alcanza la luz de los capilares sanguíneos para ser conducido al hígado por la vena porta.

La *fructosa* penetra en los enterocitos gracias a un sistema de transporte facilitado de membrana apical. La proteína responsable de su ingreso es un miembro de la familia de transportadores de monosacáridos llamado GLUT5, específico para fructosa. La absorción de fructosa se incrementa en presencia de glucosa. Desde el interior de la célula la fructosa

llega al espacio intersticial y la sangre por transportadores GLUT5 o GLUT2 de membrana basolateral. El GLUT2 es el mismo utilizado por la glucosa.

Lípidos

La hidrólisis total no es requisito indispensable para la absorción de grasas neutras. La mayor parte de la grasa ingerida es degradada a 2-monoacilglicerol, compuesto que ingresa en el enterocito. Las sales biliares tienen una importante función en la absorción de productos de la lipólisis. Cuando alcanzan la concentración micelar crítica, más baja para las sales conjugadas (por ej.: glico- y taurocolato) que para las no conjugadas, forman agregados moleculares hidrosolubles de 3 a 10 nm de diámetro, hidrofílicas en su superficie e hidrófobas en su interior.

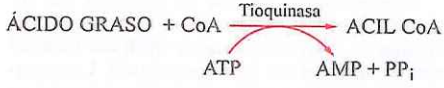
Los compuestos finales generados por la digestión, como monoacilglicéridos, ácidos grasos de cadena larga, lisofosfolípidos y colesterol y las vitaminas liposolubles, son incluidos en las micelas, lo cual les permite difundir fácilmente a través de la capa acuosa que cubre el borde en cepillo. Si estuviesen libres en el medio, esas sustancias tendrían dificultado su acceso a la membrana apical de los enterocitos.

Como la absorción de lípidos se completa en yeyuno, mientras la de sales biliares se cumple en íleo distal, se piensa que las micelas no son incorporadas enteras. Esto es apoyado por la observación de diferente velocidad de absorción para los distintos productos de la lipólisis. Si bien es posible para estos productos atravesar membranas por difusión simple, se ha demostrado la existencia de sistemas de transporte en membrana apical. Hay proteínas que fijan ácidos grasos de cadena larga y los transfieren al retículo endoplásmico liso del enterocito, donde tiene lugar su ulterior procesamiento. La proteína FAT (del inglés *fatty acid translocase*), también conocida como CD36 (del inglés *Cluster of differentiation* 36), es una glicoproteína de membrana que ejerce un papel importante en la captación de ácidos grasos. Su síntesis es particularmente significativa en intestino; su expresión aumenta por la presencia de grasas de la dieta en el lumen y en casos de obesidad y diabetes mellitus.

La pequeña cantidad de glicerol libre y los ácidos grasos de cadena de diez carbonos o menos liberados en la luz intestinal por la acción digestiva no se incorporan en las micelas; esos compuestos difunden pasivamente a través de las membranas y pasan a capilares del sistema porta (fig. 12-10).

Los enterocitos no son simplemente una vía de paso para las sustancias absorbidas, sino el centro de una muy activa e importante actividad metabólica. En la mucosa algunos de los productos absorbidos son utilizados para la síntesis de triacilgliceroles.

La principal vía de síntesis de triacilglicéridos en células intestinales parte de ácidos grasos y 2-monoacilglicerol. Los ácidos grasos son unidos a coenzima A, para dar el compuesto "activado" acil-coenzima A. La reacción es catalizada por una enzima llamada *tioquinasa*; la energía necesaria es provista por hidrólisis de ATP a AMP y pirofosfato:



La acil-CoA transfiere el ácido graso para formar uniones éster con los hidroxilos libres del 2-monoacilglicerol.

Otra vía de síntesis de triacilglicéridos y fosfolípidos, llamada vía del ácido fosfatídico, requiere glicerol-3-fosfato. Este se forma en la propia célula por fosforilación de glicerol catalizada por *gliceroquinasa* (pág. 299), o por reducción de dihidroxiacetonafosfato catalizada por *glicerofosfato deshidrogenasa* (pág. 300). La dihidroxiacetonafosfato procede de la glucólisis (vía metabólica de degradación de glucosa) (ver pág. 264).

Los triacilgliceroles neoformados, juntamente con pequeña cantidad de colesterol, fosfolípidos y proteínas, forman partículas llamadas *quilomicrones*, que pasan a los vasos linfáticos. Proteínas (apoproteínas) y fosfolípidos, compuestos anfipáticos, forman una película superficial hidró-

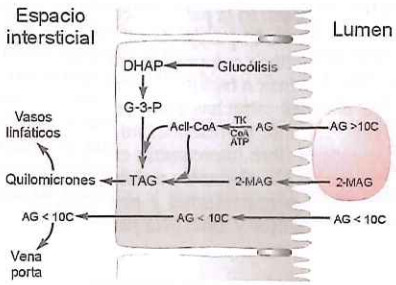


Fig. 12-10. Absorción de productos de degradación de triacilglicéridos (TAG) en enterocitos. DHAP: dihidroxiacetonafosfato; G-3-P: glicerol-3-fosfato: AG >10C: ácidos grasos de cadena mayor de diez carbonos; TK: tioquinasa; 2-MAG: 2-monoacilglicérido; AG <10C: ácidos grasos de menos de diez carbonos.

fila que confiere estabilidad en el medio acuoso a estas partículas constituidas por compuestos predominantemente hidrófobos. Más del 70% de los lípidos incorporados por la mucosa intestinal sigue la vía linfática. La figura 12-10 resume los procesos descritos.

El colesterol se absorbe en intestino y es incorporado a quilomicrones. Hay evidencias que sugieren la existencia de transportadores de colesterol, entre los que se mencionan como más importantes las proteínas NPC1L1, (de *Niemann-Pick C1-like 1*), y los ABC (*ATP binding cassette*) ABCG5 y ABCB8. Gran parte de este colesterol es esterificado con ácidos grasos en células de la mucosa e incluido en quilomicrones. La droga ezetimibe bloquea la función de NPC1L1 y reduce los niveles de colesterol en plasma.

Los fosfolípidos, en gran proporción, son degradados y sus productos incorporados a la célula. Eventualmente pueden ingresar productos de hidrólisis parcial.

Cuando las grasas no se absorben normalmente se eliminan con las materias fecales; se produce *esteatorrea*. Son causales de esteatorrea: a) falta de ácidos biliares en intestino, observada en casos de insuficiencia hepática grave o de obstrucción de vías biliares; b) ausencia o disminución de lipasa pancreática, ocasionada por daño pancreático severo u obstrucción del conducto excretor; c) deficiencias en células de la mucosa, con incapacidad para sintetizar triacilgliceroles o las apoproteínas necesarias para vehiculizarlos.

Proteínas

Como resultado de la acción de las proteasas gástrica y pancreáticas, aproximadamente un 40% del total de proteínas ingeridas es degradado hasta aminoácidos libres; el 60% restante, hasta oligopéptidos. Estos oligopéptidos, al ponerse en contacto con las peptidasas del borde en cepillo, son hidrolizados a *aminoácidos libres*, *dipéptidos* y *tripéptidos*, productos finales de la digestión.

Estos compuestos atraviesan la membrana apical utilizando distintos sistemas de transporte. Gran parte de aminoácidos libres son cotransportados con Na^+, por un sistema similar al de glucosa, dependiente de la actividad de Na^+,K^+-ATPasa. Una proporción menor de aminoácidos ingresa en la célula por difusión facilitada.

En el borde en cepillo se han identificado diversos sistemas, con especificidad para distintos grupos de aminoácidos:

a) Dependientes del gradiente de Na^+ (transporte activo secundario). Son designados con letras mayúsculas: B: fenilalanina, tirosina, triptófano, isoleucina, leucina, valina; IMINO: prolina, glicina; Y_{AG}^-: aminoácidos básicos; $B^{o,+}$: aminoácidos neutros y catiónicos (sistemas y^+L, ASC); X_{AG}: glutamato y aspartato ; A: glicina, metionina; N: glutamina, asparragina e histidina.

b) Difusión facilitada (no dependiente de Na^+). Son designados con minúsculas, a excepción de L y X_c^- Sistemas L, asc, $b^{o,+}$, y^+: aminoácidos neutros y catiónicos ; x_{AG}, X_c^-: glutamato, cistina.

Los dipéptidos y tripéptidos son captados por el transportador PEPT1 de membrana apical, que actúa por un mecanismo de cotransporte (symport) electrogénico protón/péptido. En el interior del enterocito, estos compuestos son escindidos en aminoácidos por peptidasas intracelulares.

En pacientes con *enfermedad de Hartnup*, condición hereditaria en la cual no funciona el sistema de transporte de aminoácidos neutros, éstos son absorbidos sin problemas cuando se los administra como dipéptidos. Esta observación demuestra la existencia de sistemas separados para aminoácidos libres y para di- y tripéptidos.

Desde el interior de la célula, los aminoácidos llegan a la membrana basolateral y la atraviesan por difusión facilitada para llegar a capilares del sistema de la vena porta.

En condiciones normales, el proceso de degradación de proteínas de la dieta es total, es decir, sólo llegan a la sangre aminoácidos libres. Por esta razón no tiene sentido suministrar por boca sustancias de naturaleza proteica con fines farmacológicos, pues no llegarán intactas a destino. Por ejemplo la insulina, hormona proteica administrada a diabéticos, debe inyectarse por vía parenteral; por vía oral sería desintegrada en sus 51 aminoácidos constituyentes.

Eventualmente algunos péptidos pequeños pueden escapar a la hidrólisis y llegar a los vasos sanguíneos. También es posible, en ciertas situaciones fisiológicas y patológicas, absorber proteínas enteras o fragmentos de gran tamaño. Esta se realiza por un proceso de *pinocitosis* (endocitosis de partículas pequeñas).

En los primeros días de vida la actividad proteolítica es pobre, lo cual, unido a una permeabilidad intestinal aumentada, permite el paso de polipéptidos. Este fenómeno es particularmente notable en algunos rumiantes y constituye un mecanismo fisiológico de aporte de anticuerpos de la madre al hijo. En el ternero recién nacido, por ejemplo, no existen inmunoglobulinas en sangre circulante, pero inmediatamente después de iniciar la lactancia aparecen gamaglobulinas en plasma. El calostro, secreción de la glándula mamaria en los primeros días después del parto, es muy rico en

inmunoglobulinas. La transferencia de anticuerpos por vía digestiva asegura la defensa del recién nacido contra infecciones. En el ser humano, la principal transferencia de inmunoglobulinas de la madre al hijo se realiza antes del nacimiento a través de placenta, pero también hay pasaje de anticuerpos por vía digestiva. Los niños con lactancia materna muestran mayor defensa contra infecciones que los alimentados artificialmente.

En la llamada *enfermedad celíaca* existe un defecto de la mucosa que permite absorción de polipéptidos resultantes de la digestión parcial de proteínas del trigo (gluten). Se produce intolerancia, especialmente a una pequeña proteína de 88 aminoácidos llamada *gliadina*, que determina trastornos serios. Es éste un ejemplo de absorción patológica de polipéptidos a través de intestino. Antes se reservaba el nombre enfermedad celíaca para la que afectaba a niños; en adultos se hablaba de *sprue no tropical*.

Por otra parte, es relativamente frecuente observar sensibilidad a algunas proteínas de los alimentos manifestada por fenómenos de tipo alérgico. Proteínas o polipéptidos extraños son antigénicos. Para provocar respuesta inmunitaria y producción de anticuerpos, las moléculas deben tener un tamaño relativamente grande. La existencia de pacientes sensibles a una proteína indica que absorben sin digerir esa proteína o trozos grandes de ella.

Agua y electrólitos

Diariamente ingresan al tubo digestivo unos 8 litros de agua. Dos litros proceden de los alimentos y bebidas, el resto corresponde a las secreciones que se vierten cada 24 horas en la luz gastrointestinal: saliva 1.000 mL, jugo gástrico 2.000 mL, bilis 500 mL, jugo pancreático 1.500 mL y secreciones intestinales 1.000 mL (estas cifras son promedios aproximados). La mayor parte de este líquido se absorbe en intestino delgado; menos de 1 litro llega al colon. En las porciones distales (colon y recto) se absorben alrededor de 900 mL y se eliminan con las materias fecales unos 100 mL de agua. Los movimientos de agua desde el lumen hacia la sangre y viceversa siguen los gradientes osmóticos e hidrostáticos (fuerzas de Starling) (ver pág. 619) y acompañan los movimientos de solutos a través de membranas.

Las concentraciones de los electrólitos más abundantes (Na^+, Cl^-, K^+ y HCO_3^-) en el lumen sufren modificaciones a medida que el contenido intestinal progresa a lo largo del tubo digestivo. Los niveles de Na^+ y Cl^- disminuyen, mientras los de K^+ y HCO_3^- aumentan progresivamente desde el duodeno al colon.

Existe pasaje de iones y agua a través de las uniones estrechas entre células de la mucosa (*vía paracelular*). La permeabilidad de esas uniones disminuye desde intestino delgado proximal hacia el distal y es aún menor en el colon. De cualquier modo, el mayor intercambio de agua y electrólitos se realiza por *vía transcelular*, utilizando distintos sistemas de transporte.

El Na^+ es absorbido a través de la membrana apical de enterocitos por cuatro mecanismos diferentes: 1. Difusión por canales de Na^+. 2. Cotransporte con solutos orgánicos, en los transportadores glucosa-Na^+ y aminoácidos-Na^+. 3.

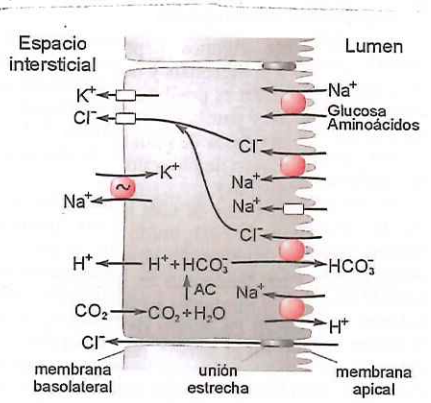


Fig. 12-11. Intercambio de iones en células de mucosa de intestino delgado. AC: anhidrasa carbónica.

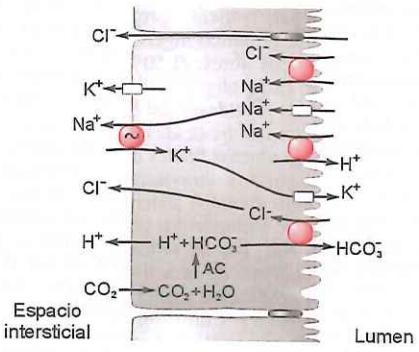


Fig. 12-12. Intercambio de iones en células de mucosa de intestino grueso. AC: anhidrasa carbónica.

Cotransporte con Cl^-. 4. Contratransporte con H^+. Los dos últimos son electroneutros; todos estos sistemas son impulsados por el gradiente de Na^+. El Na^+ ingresado en las células es expulsado hacia el intersticio por Na^+,K^+-ATPasa de membrana basolateral. La actividad de la bomba de Na^+ asegura una elevada concentración intracelular de K^+, creando un gradiente que permite salida de K^+ por canales ubicados en membrana apical y basolateral (fig. 12-11).

En intestino grueso no existen sistemas de cotransporte glucosa-Na^+ o aminoácidos-Na^+. La absorción de Na^+ en membrana apical se realiza por difusión restringida a través de canales regulados por hormonas mineralocorticoides (pág. 532) y también por contratransporte Na^+-H^+ y cotransporte Na^+-Cl^- como en intestino delgado. El K^+ sale de las células del colon por canales en mucosa apical (fig. 12-12).

La absorción de Cl^- en intestino delgado se realiza principalmente acoplada al ingreso de Na^+ en el cotransportador Na^+-Cl^-. En el íleo distal se encuentran también intercambiadores Cl^--HCO_3^-. La actividad de estos contratransportadores aumenta notablemente en colon y recto, lo que explica el alto contenido de HCO_3^- y el pH alcalino de las heces normales. El HCO_3^- se forma por acción de anhidrasa carbónica dentro de la célula con CO_2 resultante de la actividad metabólica.

El ingreso de Cl^- en la célula en contra del gradiente electroquímico es impulsado por la energía derivada de la entrada simultánea de Na^+ a favor del gradiente en el cotransportador Na^+-Cl^- y por la salida de HCO_3^- a favor del gradiente en el intercambiador Cl^--HCO_3^-.

Existe una diferencia de potencial transcelular; el lado de la serosa (intersticio) es relativamente positivo con respecto al lumen. Este gradiente, mayor en colon que en intestino delgado, impulsa la difusión de Cl^- hacia el espacio intersticial.

RESUMEN

La digestión es el proceso de degradación de moléculas complejas introducidas con los alimentos en el tracto oro-gastro-intestinal. Se cumple mediante reacciones de hidrólisis catalizadas por enzimas contenidas en secreciones de diversas glándulas.

Saliva. Concentración de Na^+ y Cl^- más baja y de K^+ y bicarbonato más alta que en plasma. *Ptialina* o *amilasa salival* (endoamilasa) cataliza hidrólisis de uniones glucosídicas α-1⟶4 del interior de la molécula; pH óptimo alrededor de 7,0, requiere Cl^-. Degrada amilosa hasta maltosas; la amilopectina también es hidrolizada a maltosas, pero como no ataca los enlaces α-1⟶6, quedan fragmentos formados por varios restos glucosa alrededor del arranque de ramificaciones (dextrinas límite). Su acción es limitada; es inhibida en el estómago por la acidez del jugo gástrico. *Lipasa* (secretada por glándulas del dorso de la lengua).

Jugo gástrico. Las células parietales excretan H^+ y Cl^-. El transporte de protones es realizado por H^+,K^+-ATPasa. Los protones se generan en las células por acción de anhidrasa carbónica que cataliza la formación de ácido carbónico a partir de CO_2 y H_2O. El H_2CO_3 se ioniza en bicarbonato e H^+. El HCO_3^- pasa al plasma ("marea alcalina" postprandial). Los iones Cl^- llegan a la cavidad gástrica desde el plasma por canales específicos. La concentración de HCl en jugo gástrico alcanza a 0,17 M y el pH a 0,87. *Aclorhidria*: falta de HCl; *hipoclorhidria* e *hiperclorhidria*: trastornos frecuentemente observados en clínica. La principal acción digestiva en estómago es la hidrólisis parcial de proteínas catalizada por *pepsina*, endopeptidasa, pH óptimo de 1,0 a 2,0, secretada como *pepsinógeno* por las células principales y activado por H^+; también es activado por la pepsina ya formada, que actúa autocatalíticamente. *Lipasa* gástrica; al igual que la lingual, cataliza la hidrólisis de uniones éster externas de triacilgliceroles con ácidos grasos de cadena corta o media. Las células parietales secretan *factor intrínseco*, glicoproteína necesaria para la absorción de vitamina B_{12}.

Jugo pancreático. Contiene poderosas hidrolasas. *Tripsina*, endopeptidasa, ataca selectivamente uniones que comprenden al carboxilo de lisina y arginina; pH óptimo 8,0 a 8,5; secretada como *tripsinógeno*, activado por enteropeptidasa y por autocatálisis. La activación se produce por separación de un hexapéptido N-terminal. *Quimotripsina*, endopeptidasa, prefiere uniones al carboxilo de aminoácidos aromáticos; secretada como *quimotripsinógeno*, activado por tripsina. *Carboxipeptidasa*, exopeptidasa, ataca la última unión peptídica y libera el aminoácido C-terminal; secretada como procarboxipeptidasa y activada por tripsina. *Elastasa* actúa sobre elastina. *Amilasa*, hidroliza almidón por un mecanismo idéntico al de ptialina. *Lipasa*, hidroliza uniones éster en los alcoholes primarios del glicerol de grasas neutras; su acción es facilitada por *colipasa*. *Colesterolesterasa* hidroliza ésteres de colesterol. *Fosfolipasa A2* ataca el enlace del ácido graso unido a C2 en glicerofosfolípidos. *Ribo-* y *desoxirribonucleasas*.

Mucosa intestinal. Enzimas digestivas del borde en cepillo: *Enteroquinasa* o *enteropeptidasa*, cataliza la activación de tripsinógeno. *Dipeptidasas*. *Aminopeptidasas*, hidrolizan la unión peptídica más próxima al extremo N-terminal. *Disacaridasas* bifuncionales*: Sacarasa-isomaltasa, lactasa-florizina hidrolasa, maltasa-glucoamilasa. Nucleotidasas, fosfatasas* y *nucleosidasas*.

Bilis. Bilirrubina, pigmento resultante de la degradación del hemo, se excreta como glucurónido. Los ácidos biliares, cólico y quenodesoxicólico, se sintetizan en hígado a partir de colesterol. Son excretados conjugados con glicina o taurina (ácidos glicocólico y taurocólico). A pH fisiológico están ionizados y neutralizados por Na^+ (sales biliares).

Tienen acción emulsionante sobre grasas, favorecen absorción de vitaminas liposolubles, estimulan la producción de bilis por hígado. El colesterol es componente normal de la bilis; suele precipitar y formar cálculos.

Absorción. *Carbohidratos*: sólo se absorben monosacáridos. D-glucosa es captada en la mucosa intestinal por un cotransportador Na^+-glucosa (SGLT1) dependiente de la bomba de sodio (Na^+,K^+-ATPasa). Fructosa es absorbida por transporte facilitado (GLUT5). Desde la mucosa al intersticio pasan por transportadores GLUT2. *Grasas*: la hidrólisis total no es indispensable para la absorción. Se incorporan productos de digestión parcial, solubilizados en micelas (con ácidos biliares, fosfolípidos y monoacilglicéridos). Glicerol y ácidos grasos de menos de 10 C pasan directamente al sistema porta. Las células de mucosa completan la hidrólisis de productos incorporados sin degradar totalmente y resintetizan triacilgliceroles que pasan a los vasos linfáticos incluidos en *quilomicrones*. El colesterol absorbido es incorporado a quilomicrones. *Proteínas*: en condiciones normales, sólo se absorben aminoácidos libres por distintos sistemas, unos por cotransporte con Na^+ y otros independientes de Na^+.

BIBLIOGRAFÍA

Bröer S. (2008). Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiological Reviews*, 88: 249-298.

Hannelore D. (2004). Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annual Review of Physiology*, 66: 361-384.

Hersey S.J., Sachs G. (1995). Gastric acid secretion. *Physiological Reviews*, 75: 155-189.

Igbal J., Hussein M.M. (2009). Intestinal lipid absorption. American Journal of Physiology. *Endocrinology and Metabolism*, 296: E1183-E1194.

Johnson L.R. (1997), *Gastrointestinal Physiology*, 5ta. Ed., Mostby, St. Louis.

Swallow D.M. (2003). Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annual Review of Genetics*, 37: 197-219.

Yamada T. y col. (2003). *Textbook of Gastroenterology*, 4ta. Ed., Lippincott Co., Filadelfia.

Yao X. (2003). Cell biology of acid secretion by the parietal cell. *Annual Review of Physiology*, 65: 103-131.

CAPÍTULO 13

Metabolismo

El conjunto de las reacciones químicas que tienen lugar en el seno de los tejidos constituye el llamado metabolismo o, más precisamente, *metabolismo intermedio*. Las reacciones del proceso de digestión previo a la absorción de sustancias en el tracto gastrointestinal se consideradan etapas premetabólicas.

El metabolismo intermedio comprende procesos de naturaleza muy variada, dirigidos a cumplir los siguientes fines: 1) Obtener energía y poder reductor a partir de los alimentos. 2) Sintetizar los componentes del organismo y generar la energía y poder reductor necesarios para esas síntesis. 3) Degradar los compuestos ingresados en productos más simples, utilizables como precursores para la síntesis de moléculas endógenas (proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos, lípidos complejos y otras sustancias) necesarias para mantener las estructuras y funcionamiento del organismo. Los procesos degradativos corresponden al llamado *catabolismo* y los procesos de biosíntesis, al *anabolismo*.

VÍAS METABÓLICAS

Generalmente las transformaciones metabólicas, tanto de degradación como de síntesis, se realizan a través de series de reacciones catalizadas por enzimas, ordenadas en una secuencia definida.

Cada una de esas series de reacciones, llamadas *vías metabólicas*, convierte un compuesto precursor o inicial en un determinado producto final.

Comúnmente el sustrato inicial, bajo la acción de una enzima específica, es convertido en un producto que sirve de sustrato a otra enzima en la reacción siguiente y así sucesivamente hasta

Fig. 13-1. Secuencia lineal de reacciones.

llegar al producto final, en una secuencia lineal de reacciones (fig. 13-1).

La sustancia A (*sustrato inicial*) se transforma en B por acción de la enzima *a*; B es convertida en C por la enzima *b*, etc., hasta obtener el producto final E. Esta vía metabólica comprende cuatro etapas o reacciones catalizadas por sendas enzimas. Las sustancias B, C y D son los productos intermedios o *metabolitos*.

Existen vías más complejas, que incluyen puntos de ramificación (fig. 13-2).

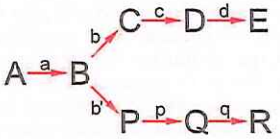


Fig. 13-2. Ramificación en una secuencia de reacciones.

donde B, producto de transformación de A, tiene dos vías alternativas. La enzima *b* cataliza la conversión de B en C, que luego de varias etapas da el producto final E. En la otra vía, B puede formar P por acción de la enzima *b'*; las reacciones subsiguientes conducen desde P hasta la formación de R.

Si todas las reacciones que integran la vía metabólica fuesen reversibles, las transformaciones podrían recorrerse por el mismo camino en ambos sentidos. Partiendo de E como sustrato inicial se llega a A, ahora producto final, por un camino exactamente inverso al que lleva de A a E (fig. 13-3).

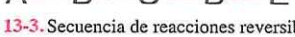


Fig. 13-3. Secuencia de reacciones reversibles.

Cuando una o más de las reacciones de la vía son prácticamente irreversibles, el camino de vuelta debe realizar desvíos (fig. 13-4).

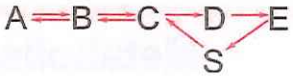


Fig. 13-4. Reversibilidad de una vía metabólica a través de un desvío.

Como las reacciones C→D y D→E son esencialmente irreversibles, el camino de vuelta, entre E y C, requiere la formación de otro producto intermedio S.

En algunos casos las transformaciones ocurren en forma cíclica; son los llamados *ciclos metabólicos*. Un ciclo comprende una serie ordenada de reacciones que termina regenerando el compuesto inicial (fig. 13-5).

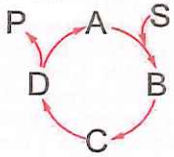


Fig. 13-5. Ciclo metabólico.

En el ejemplo de la figura 13-5, el ciclo empieza con la reacción entre A y S para formar la sustancia B. El producto B se convierte en C y éste en D, que finalmente se descompone en dos productos, P y A. La sustancia P es liberada y A inicia una nueva serie de reacciones combinándose con otra molécula de S. Las sustancias aportadas desde el exterior (S en este ejemplo) son llamadas *alimentadoras*; A, B, C y D, generados durante el funcionamiento del ciclo, son los metabolitos intermedios y P es el producto liberado.

Existen ciclos interconectados por uno o más metabolitos intermedios comunes (fig. 13-6).

Los ciclos I y II comparten el intermediario C. Las sustancias S y X son alimentadoras; P e Y, productos liberados. A nivel del compuesto C se establece una conexión que determina el funcionamiento interdependiente de ambos ciclos, como las ruedas dentadas de un engranaje.

En otros procesos metabólicos las reacciones siguen una disposición escalonada o "*en cascada*" (fig. 13-7). Generalmente se trata de reac-

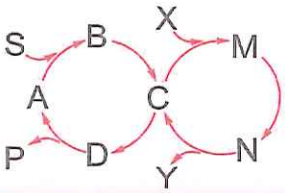


Fig. 13-6. Ciclos metabólicos interconectados por un intermediario común (C).

ciones de activación enzimática. Por ejemplo, el zimógeno A es transformado por la enzima *a* en el producto activo B. Este produce la conversión de M en la enzima activa N, la cual, a su vez, acelera la conversión de X en Y. En este tipo de procesos se obtiene una amplificación progresiva de la respuesta. Ello es indispensable en los casos en los cuales se requiere producción rápida y abundante del compuesto final. El proceso de coagulación de la sangre (pág. 695) es ejemplo de esta clase de secuencia de reacciones.

Las vías metabólicas se distinguen en: a) catabólicas, b) anabólicas y c) anfibólicas.

Vías catabólicas: La molécula del sustrato inicial es reducida a compuestos más simples. Comprenden reacciones oxidativas y su resultante energética es exergónica (−ΔG). La energía liberada es atrapada y conservada en forma de ATP y los equivalentes de reducción tomados del sustrato son aceptados por coenzimas de oxidorreducción (ej.: NAD^+). Ejemplos de estas vías son la glucólisis y la oxidación de ácidos grasos.

Vías anabólicas: Forman nuevos enlaces químicos y productos finales más complejos que los iniciales. Comprenden reacciones endergónicas (+ΔG), que transcurren gracias a su acoplamiento con reacciones exergónicas (comúnmente hidrólisis de ATP). Tienen en general carácter reductivo; la coenzima NADPH es el principal donante de hidrógenos en procesos anabólicos. Ejemplos: síntesis de ácidos grasos o colesterol.

Vías anfibólicas: Pueden funcionar como anabólicas o catabólicas según las necesidades. Degradan sustratos oxidativamente, pero también producen metabolitos utilizables para síntesis.

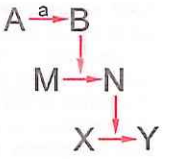


Fig. 13-7. Secuencia metabólica escalonada o en cascada.

Ejemplo: el ciclo de los ácidos tricarboxílicos oxida acetato a CO_2 y H_2O con producción de energía y genera intermediarios que pueden servir como sustratos de diversas síntesis.

La biosíntesis y la degradación de las estructuras moleculares de los seres vivos funcionan continuamente. Por ello dichas estructuras no son entidades estáticas e inmutables; se encuentran en permamente recambio. En todo organismo viviente existe un *equilibrio dinámico* entre anabolismo y catabolismo.

Como consecuencia de este equilibrio se establece un balance material entre el organismo y su entorno. Los alimentos proveen la energía y los elementos necesarios para la reparación y mantenimiento de las estructuras vitales. Los desechos de las transformaciones metabólicas y los elementos no utilizados se excretan a través de los emuntorios.

En el individuo normal adulto el equilibrio se manifiesta por la igualdad entre los totales de átomos ingresados y excretados. El mantenimiento de este balance es característico del estado de salud y exige proveer, en cantidad y calidad adecuadas, los requerimientos nutricionales.

En el organismo joven en crecimiento existe predominio del anabolismo, lo cual importa incorporación neta de materia. En la edad senil, en cambio, el balance se desvía en favor del catabolismo. En muchas condiciones patológicas, el equilibrio entre anabolismo y catabolismo suele alterarse en uno u otro sentido.

ESTUDIOS DEL METABOLISMO

El estado actual del conocimiento sobre metabolismo intermedio es el resultado de las contribuciones de miles de investigadores. Paso a paso se han ido develando los secretos del intrincado laberinto de transformaciones bioquímicas.

No ha sido ésta una tarea simple. La resolución completa de una vía metabólica presenta enormes dificultades. La determinación de cada una de sus etapas choca a menudo con los inconvenientes que significan la reducida concentración y la vida extremadamente efímera de muchos de los metabolitos intermediarios.

No obstante, se ha logrado determinar con precisión numerosas vías metabólicas, establecer sus interconexiones y elaborar complejos "mapas metabólicos" en los cuales se da una visión integrada de esas vías.

¿Cómo ha sido posible llegar a esos conocimientos? ¿Qué metodologías han permitido salvar escollos que parecían infranqueables? Haremos una breve referencia de los principales métodos utilizados en las investigaciones en este campo.

Los primeros estudios relacionados con el balance material demostraron que ciertas sustancias precursoras eran convertidas por organismos vivientes en un producto final determinado.

Las observaciones sobre el proceso de fermentación sentaron las bases de ese balance material y destacaron la importancia de la catálisis. Por ejemplo, la fermentación de la glucosa por la levadura de cerveza produce dióxido de carbono y etanol según la siguiente ecuación general:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\,CO_2 + 2\,C_2H_5OH$$

El carbono no se forma ni se pierde en el proceso; los átomos de C de la molécula de glucosa original son los mismos de los productos finales.

Los aportes de Claude Bernard se cuentan entre los primeros en este campo. Se sabía que la glucosa se formaba en el hígado, el cual la secretaba a la circulación. Bernard logró demostrar que una sustancia polimérica, el glucógeno, era la precursora de la glucosa liberada.

De estas primeras evidencias surgieron con firmeza los conceptos de transformación de precursores en productos, de balance material y del papel fundamental de catalizadores, a partir de los cuales fueron sucesivamente demostradas las diversas series de reacciones o vías metabólicas.

Métodos de investigación

El uso de *"marcadores"* es uno de los recursos metodológicos más fructíferos en los estudios metabólicos. La sustancia precursora es "etiquetada" o "marcada" de tal modo que se puede rastrear su distribución y sus transformaciones.

Uno de los ejemplos clásicos de este tipo de método es el experimento de von Knoop en 1904 sobre oxidación de ácidos grasos en el organismo. Los ácidos grasos eran marcados acoplándoles un radical fenilo. Los productos finales de la oxidación de esos ácidos seguían unidos al núcleo fenilo, lo cual permitía identificarlos.

Posteriores adquisiciones, particularmente el uso de *elementos isotópicos* artificiales incorporados como marcadores de una sustancia precursora, contribuyeron a mejorar sustancialmente la técnica. El organismo no distingue entre elementos isotópicos artificiales y elementos naturales, lo cual significa que ambos sufren exactamente el mismo tratamiento metabólico. Utilizando ya sea isótopos estables "pesados" o isótopos radiactivos, la distribución y destino de una sustancia

pueden ser seguidos mediante diferentes métodos de detección.

Entre los estudios iniciales con esta técnica fueron de gran importancia los trabajos de Schoenheimer con precursores marcados con isótopos "pesados", como el deuterio (^2H) y el ^{15}N. Con ellos pudo establecer que las moléculas constituyentes de la materia viva están en constante degradación y resíntesis. De estos experimentos surgieron los conceptos de *recambio* de los componentes corporales y de "*vida media*", tiempo en el cual se renueva el 50% de un determinado compuesto en un tejido.

El uso de isótopos radiactivos ha permitido realizar una verdadera "disección" de muchas vías metabólicas y ha convertido a esta metodología en un auxiliar insustituible en la investigación bioquímica.

Otra línea de ataque ha sido el estudio de *enzimas* aisladas. El análisis de las propiedades de estos catalizadores biológicos brinda conocimientos muy importantes para aclarar el funcionamiento de una vía metabólica. También el uso de *inhibidores* específicos de una enzima ha posibilitado el estudio de secuencias metabólicas y la identificación de metabolitos intermedios. Cuando una enzima es inhibida, se establece un *bloqueo* o interrupción en la vía metabólica correspondiente, se acumula el metabolito sustrato de esa enzima y eventualmente otros intermediarios que lo preceden en la secuencia de reacciones.

Se producen también bloqueos metabólicos en individuos que carecen de una enzima determinada. Estos defectos son generalmente de origen genético; corresponden a las enfermedades llamadas *errores congénitos de metabolismo*. El estudio de estos casos, considerados verdaderos "experimentos de la naturaleza", ha permitido conocer importantes aspectos de numerosas vías metabólicas.

Técnicas desarrolladas por la biología molecular, que logran anular o reducir la expresión o la actividad de una determinada enzima, (ratones "*knock out*", mutagénesis dirigida, interferencia por ARN, ver Cap. 22) han brindado nuevos y valiosos recursos para las investigaciones del metabolismo.

Sistemas empleados en estudios metabólicos

Los métodos mencionados han sido aplicados al estudio de diferentes sistemas biológicos. Estos deben ser seleccionados de acuerdo con los objetivos específicos de la investigación o de las posibilidades metodológicas. Entre estos sistemas pueden citarse:

1. *Animal intacto* (estudios *in vivo*). Los experimentos se realizan en el organismo completo.

2. *Órgano intacto* (*in vivo* o *in vitro*). Se utiliza un órgano, ya sea *in situ* o aislado. La sustancia precursora se agrega por perfusión a través del sistema arterial del órgano y se obtienen muestras de la sangre o el líquido perfundido que sale por el sistema venoso para el análisis de productos formados.

3. *Cortes de tejido* (*in vitro*). El experimento se realiza con finas secciones de un tejido, en las cuales la difusión de las sustancias agregadas o eliminadas se facilita por la delgadez del corte y por la ruptura de membranas celulares en la superficie de sección.

4. *Células enteras*. Los experimentos se realizan con una población homogénea de células, ya sea aislada de tejidos por diferentes procedimientos, o desarrollada en cultivo.

5. *Homogeneizados de tejidos* (*in vitro*). Son preparaciones en las cuales las membranas plasmáticas son destruidas por ruptura de las células con medios mecánicos o de otro tipo. Si se realiza esta ruptura en soluciones isotónicas, con precauciones especiales, es posible separar organelas subcelulares intactas mediante centrifugación fraccionada del homogeneizado (distintas partículas tienen diferente densidad). Se obtienen así preparaciones más o menos homogéneas de núcleos, mitocondrias, lisosomas y otras organelas.

6. *Extractos de tejidos*. A partir de extractos se aíslan y purifican enzimas, factores o metabolitos. El reconocimiento y determinación de éstos, aun en concentraciones muy bajas, es posible hoy con la ayuda de métodos extraordinariamente sensibles.

Espectrometría de resonancia magnética nuclear (NMR). Ha comenzado a utilizarse en los últimos años con sorprendentes resultados. Los espectros de resonancia magnética nuclear permiten investigar transformaciones químicas, identificar intermediarios metabólicos, y determinar la intensidad del flujo de metabolitos en distintas vías directamente en células, órganos y aun seres vivos enteros por una técnica no invasiva, que no perturba las interrelaciones y condiciones fisiológicas. Este método brinda una nueva visión de la bioquímica.

Metaboloma

Como correlato de los estudios del genoma y proteoma (págs. 242 y 458), comenzaron a de-

sarrollarse estudios a fin de identificar las moléculas de masa pequeña resultantes de las transformaciones químicas, es decir los metabolitos, existentes en los tejidos humanos. El conjunto de estos metabolitos representa lo que se ha dado en llamar *metaboloma*.

Se calcula que el metaboloma normal comprende, como mínimo, unos 3.000 compuestos, pero algunos autores dan cifras mucho más elevadas (hasta 100.000). El problema es que, además de los alimentos habituales, al organismo ingresan múltiples sustancias del ambiente, fármacos y toxinas que generan nuevos compuestos y hacen difícil determinar el número de los posibles productos derivados de ellos.

Se afirma que el metaboloma es el mejor indicador del fenotipo de cada individuo. El perfil metabólico de un tejido en un momento o en condiciones particulares como, por ejemplo, en casos de enfermedad, puede tener características peculiares; de allí el interés médico de estos estudios.

El avance de la "metabolómica" ha sido paralelo al desarrollo de técnicas analíticas altamente resolutivas, especialmente la electroforesis capilar, la cromatografía gaseosa, la cromatografía líquida (de alto y de ultra rendimiento (*high* and *ultra performance*, HPLC y UPLC) seguidas de espectrometría de masa y resonancia nuclear magnética (NMR).

REGULACIÓN

La presencia en el interior de una célula del compuesto inicial de una vía metabólica y del conjunto de enzimas y factores necesarios para cumplir la correspondiente serie de reacciones asegura la transformación ordenada del precursor en un producto final determinado. Sin embargo, el funcionamiento de las múltiples vías metabólicas existentes en un organismo, y aun en una célula, exige una delicada regulación.

La oferta y demanda de un determinado compuesto varían en distintos momentos, razón por la cual el flujo de metabolitos a través de vías anabólicas o catabólicas debe ser constantemente ajustado a las necesidades. La subsistencia de una célula, y la del organismo todo, dependen de su capacidad para regular los procesos metabólicos y asegurar la constancia de los medios intra y extracelulares dentro de los estrechos límites compatibles con la normalidad de las funciones vitales.

En microorganismos, particularmente bacterias, se han estudiado a nivel molecular una cantidad de procesos de regulación. En seres vivos superiores los mecanismos de control son necesariamente más complejos. En ellos se han desarrollado sistemas responsables de la integración de los diferentes órganos y aparatos. Así, principalmente de los sistemas nervioso y endocrino depende el funcionamiento armónico e integrado de esa compleja entidad que es el organismo.

Como todas las reacciones químicas en la célula son catalizadas por enzimas, el contralor de su actividad es importante. En última instancia, la regulación de una vía metabólica se alcanza modulando la velocidad de reacciones específicas. La velocidad a la cual cursa una determinada reacción depende tanto de la cantidad absoluta de enzima presente, como de la eficiencia catalítica de la misma. La cantidad absoluta de enzima en una célula depende de la relación entre la intensidad de su producción o síntesis y la de su degradación. Como se verá más adelante, la biosíntesis de proteínas es pasible de delicados ajustes (inducción, represión). Los procesos de degradación de proteínas específicas también son regulables.

Los mecanismos de modulación de la eficiencia catalítica de enzimas comprenden, fundamentalmente, la acción de sustancias de pequeña masa molecular que actúan como *efectores alostéricos*. La actividad de enzimas importantes en el funcionamiento de una vía puede ser modificada por este tipo de efectores. Cambios en la concentración de sustratos, coenzimas y productos intermediarios o finales afectan la actividad de una enzima ya sea por estimulación (efectores positivos) o inhibición (efectores negativos).

Un tipo muy común de regulación es el mecanismo llamado de *retroalimentación* (*feedback*).

Sea una secuencia metabólica como la representada en la figura 13-8, que transforma el precursor A en el producto final D a través de tres etapas catalizadas por las enzimas *a*, *b* y *c*. El producto final (D) actúa como inhibidor alostérico de la enzima *a*. De este modo, cuando se ha acumulado una cantidad suficiente de D, esta sustancia detiene su propia producción bloqueando la conversión de nuevas moléculas de A en B. Este es un ejemplo de retroalimentación negativa, en la cual el producto final de una vía metabólica inhibe la enzima responsable de la reacción inicial.

En vías ramificadas, en las cuales las bifurcaciones llevan, a partir de un sustrato inicial, a la síntesis de productos finales distintos, cada uno de ellos puede actuar como efector alostérico negativo de la enzima del punto de ramificación

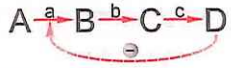


Fig. 13-8. Regulación por retroalimentación.

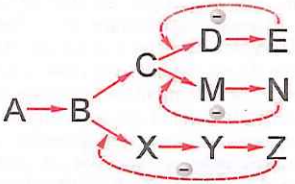


Fig. 13-9. Regulación por retroalimentación en vías ramificadas.

donde se inicia el camino de síntesis de ese producto en particular.

En el esquema de la figura 13-9 se muestran sitios de inhibición por retroalimentación en una vía metabólica ramificada.

La modificación covalente de la molécula de enzimas (por ej., adición o sustracción de fosfato, adenilación, etc.) es otro mecanismo utilizado para modular su actividad.

Más adelante se analizarán ejemplos concretos de estos tipos de control, se referirán los mecanismos de integración y el modo de acción de hormonas en la regulación del metabolismo.

Compartimentalización

En las células de eucariotas el conjunto de enzimas integrantes de cada vía metabólica suele estar confinado en un compartimiento celular definido, lo cual crea una división física del trabajo y aumenta la eficiencia de las transformaciones. No se trata sólo de encerrar las enzimas en una organela, sino además disponerlas espacialmente de manera que asegure su funcionamiento óptimo. El ordenamiento secuencial de las enzimas permite que el producto de cada reacción sea liberado en las adyacencias del sitio activo de la enzima siguiente en la vía. Se obtiene así mayor concentración del metabolito en el entorno inmediato al centro catalítico y se facilita la formación del complejo enzima-sustrato. Se habla de "canalización" o "tunelización" para indicar este encauzamiento de sustratos y metabolitos en una dirección determinada. Los recursos utilizados para alcanzar la distribución espacial adecuada de las enzimas de una vía son variados: a) inserción ordenada en una membrana (ej.: los componentes de la cadena de transporte electrónico en la membrana interna de las mitocondrias); b) formación de complejos moleculares altamente estructurados (ej.: el complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa en la matriz mitocondrial); c) interacciones débiles en enzimas solubles. Aun las enzimas aparentemente libres en el citosol deben tener algún grado de ordenamiento. De otro modo los metabolitos difundirían en el medio y los encuentros enzima-sustrato resultarían más azarosos y altamente ineficientes. Para las enzimas de la vía glucolítica en el citosol se ha propuesto la existencia de una asociación de enzimas solubles con los elementos estructurales de la matriz citoplasmática.

Por otra parte, la existencia de transportadores específicos regulables en la membrana plasmática y en las de organelas permite limitar o activar el tráfico de sustratos en la célula y modular el funcionamiento de sus vías metabólicas.

RESUMEN

El conjunto de las reacciones químicas que tienen lugar en los seres vivos se denomina *metabolismo*. Los procesos degradativos corresponden al *catabolismo*; los de síntesis, al *anabolismo*. En general, el catabolismo tiene naturaleza oxidativa y utiliza preferentemente NAD^+ como aceptor de equivalentes de reducción. El anabolismo es reductivo, con NADPH como proveedor de H. La resultante energética final del catabolismo es exergónica; el $-\Delta G$ se utiliza para transferir fosfato a ADP y sintetizar ATP. En cambio, el anabolismo comprende procesos endergónicos que emplean ATP como principal fuente de energía. En el adulto normal existe equilibrio entre catabolismo y anabolismo.

Vía metabólica es la sucesión de reacciones catalizadas por enzimas que llevan a la conversión de una sustancia en un determinado producto final. Un *ciclo metabólico* comprende una serie de reacciones en las cuales, al final del proceso, vuelve a formarse la sustancia que inicia la serie. Los *metabolitos intermedios* del ciclo se regeneran continuamente; las sustancias que ingresan son los *alimentadores*, y las que egresan, los *productos* del ciclo. Otro tipo de procesos metabólicos es el de reacciones en *cascada*, que producen notable amplificación de la respuesta.

La utilización de isótopos ha sido muy fructífera en los estudios metabólicos. Las investigaciones se realizan en animales y órganos intactos, secciones de tejidos, células enteras, homogeneizados y extractos de tejidos, y en enzimas aisladas.

El funcionamiento de las vías metabólicas es exquisitamente regulado para adecuarlo a las necesidades del organismo. Entre los mecanismos reguladores se cuentan la modulación de la actividad de enzimas (por ejemplo, efectos alostéricos y modificación covalente) y el aumento o disminución de la cantidad de moléculas de enzimas existentes en las células (inducción o represión de la síntesis). El conjunto de enzimas integrantes de cada vía metabólica suele estar confinado en un compartimiento celular definido. Esta *compartimentalización* aumenta la eficiencia de las transformaciones.

BIBLIOGRAFÍA

Blow N. (2008). Metabolomics: Biochemistry's new look. *Nature*, 455: 697-700.

Coffee C.J. (1998). *Metabolism*, Fence Creek Publishing, Wisconsin.

Huang X., Holden H.M., Raushel F.M. (2001). Channeling the substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions. *Annual Review of Biochemistry*, 70: 149-188.

Shulman R.G., Rothman D.L. (2001). NMR of intermediary metabolism: Implications for systemics physiology. *Annual Review of Physiology*, 63: 15-48.

CAPÍTULO 14

Metabolismo de hidratos de carbono

Los hidratos de carbono, principalmente el almidón, representan una proporción importante de los alimentos que componen la dieta humana. El proceso de digestión degrada los carbohidratos de los alimentos hasta el estado de monosacáridos. Sólo este tipo de compuestos se absorbe en mucosa intestinal y es metabolizado en las células.

La glucosa predomina netamente entre los monosacáridos resultantes de la digestión de alimentos comunes. La fructosa alcanza cantidades significativas si la ingesta de sacarosa es abundante. La galactosa adquiere importancia cuando el principal carbohidrato de la dieta es lactosa (en lactantes, por ejemplo).

Después de su absorción, los monosacáridos son transportados hacia el hígado por la vena porta. En hígado, tanto la galactosa como la fructosa pueden ser transformadas en metabolitos idénticos a los derivados de la glucosa. De tal modo, los tres monosacáridos tienen un destino metabólico común.

La principal función de la glucosa en el organismo es servir como combustible; su oxidación produce energía utilizable. También es usada como materia prima para algunas síntesis.

El hígado, órgano central en los procesos metabólicos, capta buena parte de la glucosa llegada por la porta y la incluye en moléculas poliméricas (glucógeno) almacenadas como material de reserva. La síntesis de glucógeno, también llamada *glucogenogénesis*, es un proceso anabólico que requiere energía.

Durante el período de absorción intestinal siguiente a una comida (período posprandial), especialmente si ésta ha sido rica en glúcidos, el hígado no alcanza a capturar toda la glucosa que le llega y a transformarla en glucógeno; parte de ella pasa a la circulación general.

Todos los tejidos reciben un aporte continuo de glucosa. Si bien muchos tejidos tienen capacidad para sintetizar y almacenar glucógeno, estos procesos son particularmente importantes en hígado y músculo. Del total de glucógeno existente en el organismo de un adulto, aproximadamente una tercera parte se encuentra en hígado y casi todo el resto en músculos. Es muy pequeña la cantidad existente en otros tejidos.

El glucógeno hepático es desdoblado para dar glucosa a la circulación general. La degradación de glucógeno a glucosa se denomina *glucogenólisis* y se cumple en hígado según las necesidades del organismo. La glucogenólisis hepática es un importante mecanismo para mantener el nivel de glucosa en sangre (*glucemia*) durante los intervalos entre comidas. La constancia en el suministro de glucosa a los tejidos es vital, especialmente para el sistema nervioso central, casi exclusivamente dependiente de glucosa sanguínea como fuente de energía.

En sangre circulante existe siempre glucosa; en el individuo normal se mantiene entre 70 y 110 mg por dL si su concentración es determinada a más de tres horas de la ingestión de alimentos. Después de cada comida se produce aumento transitorio en el nivel de glucosa en sangre.

El glucógeno del músculo sirve como reserva energética utilizada por el propio tejido cuando realiza trabajo contráctil. A diferencia del hígado, el músculo no cede glucosa libre a la circulación. En músculo la degradación de glucógeno

da piruvato[1] y lactato como productos finales.

El catabolismo de la glucosa se realiza fundamentalmente a través de las siguientes vías:

1. La *glucólisis* o *vía de Embden-Meyerhof*, cuyo producto final es piruvato; éste se reduce a lactato cuando la provisión de oxígeno es insuficiente. Es particularmente importante en músculo, que puede contraerse en anaerobiosis gracias al ATP producido por la glucólisis. El aumento de lactato detectable en sangre y orina después de un ejercicio intenso es expresión de la actividad glucolítica. En glóbulos rojos, la glucólisis es la única vía proveedora de energía.

2. En presencia de oxígeno el piruvato generado durante la glucólisis es oxidado a CO_2 y H_2O. Primero es sometido a *descarboxilación*; se desprende CO_2 y queda un resto de dos carbonos (acetato). Este resto ingresa en un ciclo metabólico llamado *ciclo del ácido cítrico, de los ácidos tricarboxílicos* o *de Krebs*, de gran rendimiento energético.

Existe una vía anabólica, llamada *gluconeogénesis*, que permite al organismo sintetizar glucosa a partir de metabolitos de distinto origen, desde lactato a compuestos procedentes del catabolismo de aminoácidos y otras sustancias no glucídicas.

Ingreso de glucosa en las células

Al considerar la absorción intestinal de glucosa (pág. 241) se mencionó la existencia en la membrana apical de enterocitos de un sistema de cotransporte Na^+/glucosa (SGLT 1) que introduce glucosa en la célula aprovechando el gradiente creado por la bomba de Na^+ (Na^+, K^+-ATPasa). Este proceso activo secundario permite acumular glucosa en el citosol. Desde aquí la hexosa pasa a la circulación portal por difusión facilitada, utilizando principalmente transportadores GLUT 2 de la membrana basolateral. GLUT 2 tiene baja afinidad para la glucosa, pero gran capacidad de transporte.

Una vez en la sangre, la glucosa llega a las células y penetra en ellas también por difusión facilitada, es decir, mediante transportadores que permiten el paso a favor del gradiente (pág. 241). Por esta razón la concentración de glucosa en el citosol, con excepción de células de mucosa intestinal y túbulos renales que disponen de sistemas de transporte activo, no puede ser mayor que la existente en sangre y líquido intersticial.

Los transportadores de glucosa por difusión facilitada forman una familia de proteínas integrales de membrana (se designan con las siglas GLUT), constituidas por una cadena polipeptídica de unos 500 aminoácidos, con doce segmentos transmembrana que forman el canal por donde la glucosa ingresa en la célula.

Transporte de glucosa. Se conocen bien dos cotransportadores activos Na^+/glucosa, el SGLT1 que sólo se encuentra en membrana apical de células epiteliales polarizadas de intestino delgado y el SGLT2 en túbulos renales. En intestino, SGLT1 introduce en los enterocitos, aun contra gradiente, glucosa libre generada por la digestión de alimentos en el lumen; en túbulos renales, SGLT2, de gran selectividad por glucosa, permite reabsorberla del líquido filtrado en los glomérulos. Alrededor de 180 g de glucosa se filtran por día en los glomérulos. Normalmente toda la glucosa filtrada es reabsorbida en los túbulos proximales.

El resto del transporte de glucosa se realiza por difusión facilitada mediada por *uniporters* distribuidos en todas las células. Se han identificado 14 miembros de la familia de estos transportadores, GLUT1 a GLUT14, que difieren en distribución tisular, especificidad, afinidad por el sustrato y propiedades funcionales. GLUT1 es ubicuo, se expresa en todas las células del feto; en adultos predomina en glóbulos rojos, fibroblastos, células endoteliales de capilares sanguíneos, barrera hematoencefálica y placenta. Tiene alta afinidad por glucosa (K_m 1,4 mM), lo que le permite actuar a velocidad máxima aun a niveles bajos de glucemia. GLUT2 está presente en membrana basolateral de epitelio intestinal y túbulos renales, en hepatocitos y células β de islotes de Langerhans del páncreas. Es el portador de menor afinidad por glucosa (K_m ~17 mM); su velocidad de transporte está directamente relacionada con el nivel de glucosa. En hígado, donde GLUT2 es abundante, cuando el nivel de glucosa es elevado (por ej., en el período posprandial) hay flujo neto de glucosa hacia el interior de las células. En cambio, si la glucemia es baja (por ej., en períodos de ayuno) se activan los procesos de glucogenólisis y gluconeogénesis, la glucosa intracelular aumenta y el flujo se invierte; sale glucosa al espacio intersticial y de allí a la sangre. GLUT2 también transporta galactosa y fructosa; esto explica el ingreso de estas hexosas a las células hepáticas, donde son metabolizadas. Las células β del páncreas son ricas en GLUT2; el ingreso

[1] Como en el organismo los ácidos orgánicos en general se encuentran ionizados, se utilizará el nombre de la forma iónica: piruvato en lugar de ácido pirúvico, lactato en vez de ácido láctico.

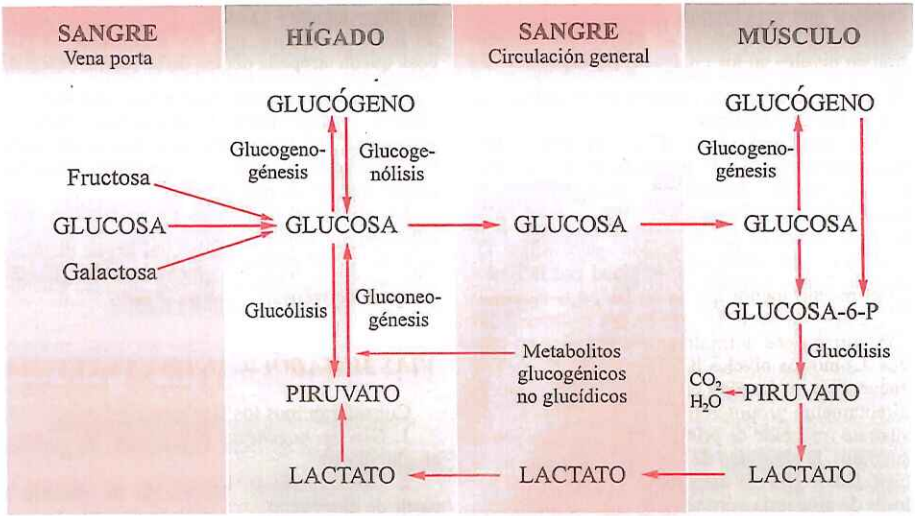


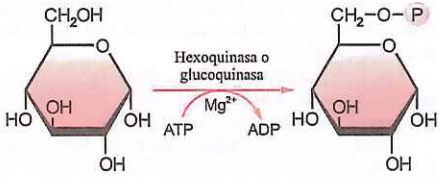
Fig. 14-1. Resumen general del metabolismo de carbohidratos.

de glucosa a esas células en proporción directa con los niveles en sangre juega un papel importante en el estímulo de la secreción de insulina y glucagón. GLUT3 es el principal transportador de glucosa en cerebro y nervios periféricos; tiene alta afinidad, asegura provisión constante de glucosa al tejido nervioso, no afectada por las fluctuaciones normales de glucemia. GLUT4 se expresa en tejido adiposo y músculos esquelético y cardíaco; su actividad es regulada por insulina. Esta hormona aumenta notablemente el transporte de glucosa hacia el citosol en esos tejidos. Cuando la glucemia es baja, la mayoría de los transportadores GLUT4 en tejido adiposo y músculo se encuentran insertos en membranas de vesículas intracelulares. Si el nivel de glucosa aumenta, se estimula la secreción de insulina, que promueve el "reclutamiento" de GLUT4 desde el interior de la célula hacia la membrana plasmática; las vesículas que contienen los portadores se fusionan con la membrana externa. El incremento de GLUT4 accesibles desde el exterior activa el ingreso de glucosa. GLUT5 es un transportador de fructosa, presente en membrana apical y basolateral de enterocitos y en testículo.

Los restantes transportadores GLUT se distribuyen en distintos tejidos; aún se conoce poco de sus propiedades y funciones. GLUT13, llamado también HMIT, no moviliza glucosa, sino que es un cotransportador H^+/mioinositol.

Fosforilación de glucosa

La reacción de fosforilación es el paso inicial de todas las vías de utilización de monosacáridos. Cualquiera sea el destino ulterior de la glucosa, la primera transformación es su esterificación con ortofosfato para formar glucosa-6-fosfato (G-6-P). Esta reacción es catalizada por *hexoquinasa*, enzima presente en todas las células.



Existen cuatro isozimas de hexoquinasa. Las isozimas I, II y III se encuentran en variadas proporciones en distintos tejidos. Son un tanto inespecíficas; fosforilan en carbono 6 a otras hexosas además de glucosa. Sus K_m para glucosa oscilan entre 0,01 y 0,1 mM, valores muy inferiores a la concentración habitual de glucosa en líquidos y células del organismo (término medio 5,0 mM). En consecuencia, a los niveles de hexosa existentes en tejidos, estas enzimas trabajan a su máxima velocidad y su actividad no se modifica por los

cambios que experimenta la glucemia. Las concentraciones fisiológicas de glucosa se encuentran en niveles en los cuales las hexoquinasas I a III están saturadas y la reacción es de orden cero con respecto al sustrato.

Las hexoquinasas I a III son inhibidas alostéricamente por G-6-P, producto de la reacción. La isozima IV, denominada *glucoquinasa*, se encuentra exclusivamente en hígado y en células β de islotes de Langerhans en páncreas. Esta enzima es altamente específica; sólo utiliza D-glucosa como sustrato; su afinidad por la hexosa es mucho menor que la de las otras isozimas (K_m mayor de 10 mM), esto es, por encima de las concentraciones normalmente existentes en tejidos. Como los niveles fisiológicos de glucosa se encuentran en la zona en la cual la actividad es directamente proporcional a la concentración de sustrato (reacción de primer orden con relación al sustrato), la actividad de la enzima depende de la cantidad de glucosa disponible; es pobre a los valores de glucemia normal en ayunas. A diferencia de las hexoquinasas I a III, la glucoquinasa no es inhibida por G-6-P.

Las características de estas enzimas tienen gran importancia funcional. Las isozimas I a III, gracias a su muy baja K_m, aseguran continua utilización de glucosa por las células y provisión permanente de energía aun cuando la glucemia experimente oscilaciones. La glucoquinasa o isozima IV, en cambio, sólo permite captar glucosa a los hepatocitos y células β del páncreas cuando los niveles en sangre aumentan significativamente, por ejemplo, después de una comida. En este sentido, hay similitud en el comportamiento de glucoquinasa y el de transportadores GLUT2.

Las hexoquinasas I a III se expresan constitutivamente en las células, en cambio, la síntesis de glucoquinasa es inducida por insulina.

Todas las hexoquinasas requieren ATP, como donante de fosfato y energía, y también Mg^{2+}. El complejo ATP-Mg actúa como sustrato.

La reacción catalizada por hexoquinasa comprende dos reacciones acopladas, la síntesis del éster glucosa-6-fosfato, endergónica, y la hidrólisis exergónica de ATP. La suma algebraica de los $\Delta G°'$ de ambas reacciones da un $\Delta G°'$ final de -4,0 kcal/mol (-16,7 kJ/mol). En condiciones fisiológicas, la reacción marcha en el sentido de fosforilación de glucosa y es prácticamente *irreversible*.

La formación de glucosa-6-fosfato, además de convertir glucosa en un compuesto más reactivo, apto para futuras transformaciones, cumple otro papel importante. Las membranas celulares son impermeables a G-6-P y ésta no puede difundir hacia el exterior; una vez fosforilada, la glucosa queda atrapada dentro de la célula, obligada a seguir las alternativas metabólicas que allí se le ofrecen. Por otra parte, la rápida conversión de glucosa en G-6-P mantiene baja la concentración intracelular de glucosa y el gradiente favorable para el ingreso de más glucosa.

La glucosa-6-fosfato es un metabolito muy importante. Constituye una *encrucijada metabólica*, de la cual parten y a la cual llegan distintas vías: glucogenogénesis, glucogenólisis, glucólisis, gluconeogénesis, pentosa fosfato.

VÍAS METABÓLICAS DE LA GLUCOSA

Consideraremos los siguientes procesos:

1. *Glucogenogénesis*. Conversión de glucosa en glucógeno.
2. *Glucogenólisis*. Liberación de glucosa a partir de glucógeno.
3. *Glucólisis* o *vía de Embden-Meyerhof*. Degradación de glucosa a piruvato y lactato.
4. *Descarboxilación oxidativa de piruvato*. El piruvato formado en la glucólisis es convertido en un resto de dos carbonos (acetato).
5. *Ciclo del ácido cítrico*, *de Krebs*, o *de ácidos tricarboxílicos*. Los restos acetato son finalmente oxidados a CO_2 y H_2O.
6. *Vía de pentosa fosfato* o *hexosa monofosfato*. Vía alternativa de oxidación de glucosa.
7. *Gluconeogénesis*. Formación de glucosa o glucógeno a partir de fuentes no glucídicas. Los principales sustratos para gluconeogénesis son aminoácidos glucogénicos, lactato y glicerol.

GLUCOGENOGÉNESIS

La síntesis de glucógeno a partir de glucosa se realiza en muchos tejidos, pero por su magnitud y significación funcional, es realmente importante en hígado y músculo.

En el ser humano, el hígado alcanza a contener hasta 8% de su peso en glucógeno, especialmente después de una alimentación rica en carbohidratos. Esa proporción se reduce considerablemente después del ayuno prolongado. En músculo esquelético, el glucógeno representa aproximadamente 1% de su peso. La glucogenogénesis es un proceso anabólico que requiere energía.

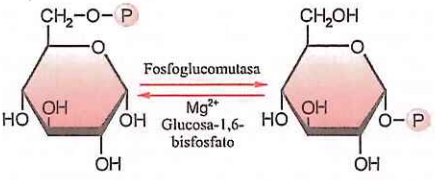
Las etapas de esta síntesis son las siguientes:

1. **Fosforilación de glucosa.** La primera etapa en la síntesis de glucógeno es la conversión de glucosa en glucosa-6-fosfato. Esta reacción,

catalizada por *hexoquinasas* (*glucoquinasa* entre ellas), fue descripta en una sección anterior.

2. **Formación de glucosa-1-fosfato.** En la segunda etapa, la *fosfoglucomutasa* cataliza la transferencia intramolecular del grupo fosfato desde carbono 6 a carbono 1. La glucosa-6-fosfato se convierte en glucosa-l-fosfato. La fosfoglucomutasa requiere Mg^{2+} y glucosa-1,6-bisfosfato[2] como cofactores. La reacción es reversible.

Defectos genéticos en esta enzima se asocian a glucogenosis XIII.



Glucosa-6-fosfato Glucosa-1-fosfato

3. **"Activación" de glucosa.** La glucosa-1-fosfato reacciona con el nucleótido de alta energía uridina-trifosfato (UTP) para dar uridina-difosfato-glucosa (UDPG) y pirofosfato (PP_i). La reacción es catalizada por *uridina-difosfato-glucosa pirofosforilasa* o *glucosa-1-P-uridiltransferasa*.

$$\text{GLUCOSA-1-P} + \text{UTP} \xrightarrow[\text{uridiltransferasa}]{\text{Glucosa-1-P}} \text{UDPG} + PP_i$$

El pirofosfato inorgánico es rápidamente hidrolizado por acción de *pirofosfatasa*. La inmediata desaparición del pirofosfato hace a la reacción prácticamente irreversible.

Su inclusión en el nucleótido-azúcar (UDPG) dota a la glucosa de la reactividad necesaria para participar en la síntesis de glucógeno. La glucosa se "activa" por su unión a UDP.

La demostración del papel metabólico de nucleótido-azúcares del tipo de UDPG fue uno de los principales aportes de Leloir.

4. **Adición de glucosas a la estructura polimérica.** En esta etapa la glucosa "activada" del UDPG es transferida a glucógeno preexistente. Se establece una unión glucosídica con el carbono 4 de una glucosa terminal en las cadenas del glucógeno.

Esta reacción es catalizada por *glucógeno sintasa*, glucosil transferasa que requiere la presencia de una estructura polimérica sobre la cual seguir agregando glucosas en unión α1→4. La reacción es prácticamente irreversible.

$$\text{UDPG} + (\text{GLUCOSA})_n \xrightarrow{\text{Glucógeno sintasa}} (\text{GLUCOSA})_{n+1} + \text{UDP}$$

Como la glucógeno sintasa sólo puede formar uniones α1→4, su acción determina alargamiento lineal de ramas preexistentes por adición sucesiva de glucosas.

5. **Formación de ramificaciones.** Cuando la acción de la glucógeno sintasa ha alargado una cadena hasta diez o más residuos de glucosa, interviene otra enzima que secciona un segmento terminal de no menos de seis glucosas para insertarlo, mediante unión glucosídica α1→6, sobre otra cadena vecina (fig. 14-2). La enzima es la *amilo-α(1,4)→α(1,6)-glucantransferasa* o *enzima ramificante*.

De este modo, la molécula de glucógeno va siendo modelada por acción conjunta de glucógeno sintasa y enzima ramificante.

La glucógeno sintasa está presente en los tejidos en dos formas interconvertibles: *b* (inactiva, fosforilada) y *a* (activa, desfosforilada). La forma *b* sólo muestra actividad en presencia de concentraciones saturantes de glucosa-6-fosfato, que actúa como efector alostérico positivo. La forma *a* es activa, independientemente de la existencia de G-6-P. La sintasa *b* es transformada en forma *a* por acción de una fosfatasa. La forma activa se reconvierte en *b* por fosforilación enzimática. Este tipo de efectos sobre la glucógeno sintasa indica su carácter de enzima regulatoria, a través de la cual es posible modular la glucogenogénesis. El tema será tratado más adelante.

Glucogenina. La acción de glucógeno sintasa produce adición de unidades glucosa a glucógeno

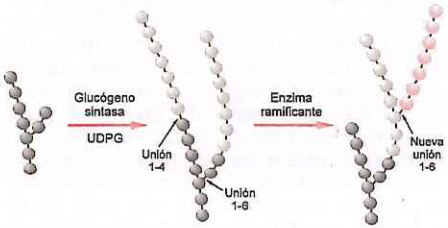


Fig. 14-2. Representación esquemática de la acción de la enzima ramificante. Las esferas negras representan restos de glucosa del polímero preexistente; las esferas grises indican los restos glucosa adicionados por acción de la glucógeno sintasa; las rojas, el segmento de cadena transferido por la enzima ramificante.

[2] Se habla de *bisfosfato* cuando en la misma molécula existen dos fosfatos separados, es decir, unidos a distintos sitios (ej.: Glucosa-1,6-bisfosfato). Si los dos fosfatos están ligados entre sí por unión anhidrido es difosfato (ej.: ADP).

preexistente. La enzima no actúa si no hay polisacárido receptor de nuevas glucosas. Sin embargo, la síntesis en ausencia total de glucógeno es posible; requiere una proteína iniciadora llamada *glucogenina*, que actúa como aceptora de la primera glucosa, en unión glucosídica con un resto tirosina de la proteína. El proceso es autocatalítico, utiliza UDPG como donante de glucosa. La glucogenina cataliza también la adición sucesiva de unidades hasta formar una cadena lineal de seis a siete glucosas en enlaces α(1→4). Sobre esta cadena "anclada" en glucogenina continúan actuando la glucógeno sintasa y la enzima ramificante para dar al polímero su estructura característica. Cada molécula de glucógeno está covalentemente ligada a una proteína iniciadora, razón por la cual el número de partículas de glucógeno en la célula depende de la disponibilidad de glucogenina.

Costo energético de la síntesis de glucógeno

La incorporación de glucosa a glucógeno es un proceso endergónico; requiere suministro de energía. La primera reacción de fosforilación (1), común a todas las vías de utilización de glucosa, consume una molécula de ATP. En la reacción de "activación" de glucosa (3) interviene UTP, compuesto con enlaces ricos en energía. En la reacción siguiente (4) se libera UDP. El UTP es regenerado a partir de UDP en reacción catalizada por la *nucleósido difosfoquinasa*:

$$UDP + ATP \rightleftharpoons UTP + ADP$$

La incorporación de una molécula de glucosa al glucógeno consume dos de ATP. Este gasto energético destinado a almacenar glucosa parecería sin sentido; resultaría más económico acumular G-6-P, ya que esta sustancia es incapaz de difundir al exterior. Pero esto es impracticable en condiciones fisiológicas; la presión osmótica de una solución depende del número de partículas dispersas y no del tamaño de éstas. Una molécula de glucógeno, compuesta por muchos miles de unidades glucosa, es equivalente desde el punto de vista osmótico a una molécula de G-6-P o de cualquier otro soluto. El acúmulo de un número de moléculas de G-6-P similar al de unidades contenidas en el glucógeno produciría gran incremento de la presión osmótica, hinchamiento y destrucción de la célula. Con glucógeno, en cambio, ese aumento es prácticamente despreciable.

GLUCOGENÓLISIS

La glucogenólisis no es simplemente el proceso inverso de la glucogenogénesis. Como en esta última vía existen etapas irreversibles, la degradación de glucógeno debe realizarse utilizando, en esos pasos, enzimas distintas a las de la vía anabólica. Las etapas de glucogenólisis son las siguientes:

1. **Fosforólisis de glucógeno.** La degradación de glucógeno es iniciada por la acción de *fosforilasa*, que cataliza la ruptura de uniones glucosídicas α(1→4) por inserción de fosfato en el carbono 1. El fosfato utilizado en esta reacción proviene del medio (P_i); no es necesario gasto de ATP. La fosforilasa actúa a partir del extremo no reductor de las ramificaciones y libera glucosa-1-fosfato. La acción enzimática se detiene cuatro restos glucosa antes de la próxima unión α1→6 (fig. 14-3). Aquí interviene otra enzima, *oligo-α(1,4)-α(1,4)-glucantransferasa*, que desprende el trisacárido terminal de la ramificación y lo transfiere al extremo de una rama vecina, al cual lo une por enlace α1→4. La ramificación queda reducida a una sola glucosa con unión α1→6.

La fosforilasa contiene piridoxal fosfato unido covalentemente, que actúa como cofactor esencial promoviendo el ataque del enlace glucosídico por P_i. Es una importante enzima regulatoria que responde a efectores alostéricos y a modificación covalente (fosforilación-desfosforilación); en el capítulo 19 volveremos sobre este tema.

2. **Hidrólisis de uniones glucosídicas α1→6.** La ruptura de este enlace se realiza por hidrólisis, catalizada por *α(1→6)-glucosidasa* o *enzima desramificante*, que deja glucosa en libertad. Las actividades *oligo-α(1,4)→α(1,4)-glucantransferasa* y *α(1→6)-glucosidasa* están asignadas a una misma proteína con dos sitios activos de distinta especificidad.

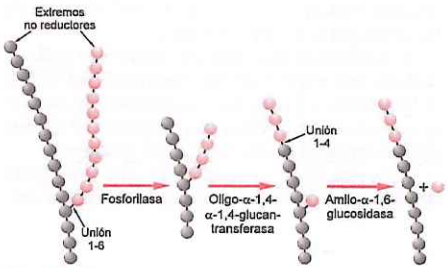


Fig. 14-3. Representación de la acción de oligo-α(1,4)-α(1,4)-glucantransferasa y α-(1,6)-glucosidasa (enzima desramificante). Las esferas rojas representan los restos glucosa de la ramificación que es degradada.

Después de esta intervención de la enzima desramificante, la cadena es de nuevo atacada por la fosforilasa, que continúa liberando glucosa-1-P hasta que la próxima unión α(1→6) se encuentre a una distancia de cuatro restos glucosa; entonces se repite la participación de las otras enzimas. La acción concertada de fosforilasa, oligo-α(1,4)→α(1,4)-glucantransferasa y α(1→6)-glucosidasa libera glucosa-1-P y algunas glucosas (la enzima desramificante actúa por hidrólisis y no por fosforólisis). En promedio, se produce una glucosa libre por cada nueve glucosas-1-P, lo cual da una idea del grado de ramificación en la molécula de glucógeno. Sólo unidades glucosa en la posición de ramificación son liberadas como glucosa libre. Todas las otras aparecen como G-1-P.

3. **Formación de glucosa-6-fosfato.** La glucosa-1-fosfato es convertida en glucosa-6-fosfato por la *fosfoglucomutasa*. Es la misma reacción de la glucogenogénesis, en sentido inverso.

4. **Formación de glucosa libre.** La última etapa es la hidrólisis de glucosa-6-fosfato a glucosa y fosfato inorgánico, catalizada por *glucosa-6-fosfatasa*.

$$\text{GLUCOSA-6-P} \xrightarrow[H_2O]{\text{Glucosa-6-fosfatasa}} \text{GLUCOSA} + P_i$$

En el camino de síntesis, la reacción de glucosa a G-6-P catalizada por glucoquinasa es esencialmente irreversible. Por esta razón, el proceso inverso es cumplido por otra enzima. La glucosa-6-fosfatasa se encuentra en membranas de retículo endoplásmico (RE) de hígado, riñón e intestino, pero no en músculo. Esto explica por qué el hígado, riñón e intestino pueden ceder glucosa a la circulación y el músculo no.

La enzima está integrada en un complejo formado por cinco subunidades, tres de las cuales son transportadores de sustratos y productos a través de la membrana del RE. Uno de ellos es un transportador de la familia GLUT, el GLUT7, que permite el paso hacia el citosol de la glucosa liberada dentro de las cisternas del RE.

En músculo, el glucógeno inicia su degradación con etapas similares a las descriptas en esta sección. La glucosa-6-fosfato formada no puede hidrolizarse por falta de glucosa-6-fosfatasa y sigue su camino catabólico en el propio músculo, principalmente por vía de la glucólisis.

El esquema de la figura 14-4 resume las vías de síntesis y degradación de glucógeno en hígado.

Papel funcional del glucógeno. En la mayoría de tejidos el glucógeno representa una reserva

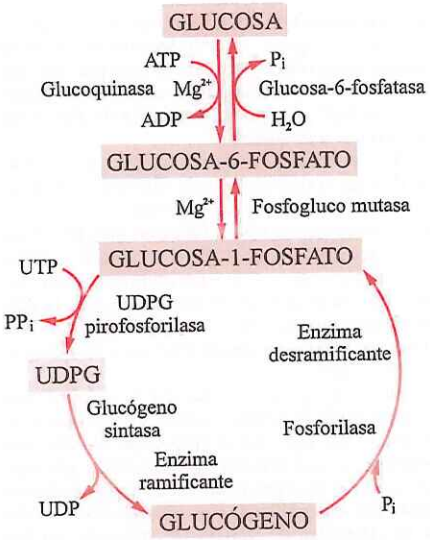


Fig. 14-4. Vías de síntesis y degradación de glucógeno en el hígado.

a la cual se recurre para obtener glucosa durante períodos de ayuno, hipoglucemia o hipoxia. Sin embargo, el papel del glucógeno no es el mismo en todos los órganos. Especialmente notable es la diferencia entre hígado y músculo, ambos muy ricos en glucógeno.

El *hígado* cumple un rol muy importante como regulador de la glucemia, asegurando la provisión constante de glucosa a todos los tejidos. Inmediatamente después de una comida aumenta transitoriamente la glucemia. En estos períodos de exceso de oferta, el hígado sustrae glucosa de la circulación y la almacena como glucógeno. En los intervalos entre comidas, el hígado degrada su glucógeno y libera glucosa a la sangre.

En *músculo* el glucógeno actúa como reserva rápidamente movilizable que provee combustible para la contracción. El músculo no puede liberar glucosa a la circulación, sus depósitos de glucógeno son utilizados exclusivamente por el propio tejido.

ENFERMEDADES GENÉTICAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO DEL GLUCÓGENO

Estas enfermedades se deben a trastornos genéticos que determinan ausencia o disminución marcada de una determinada actividad enzimáti-

ca relacionada con las vías de síntesis o degradación de glucógeno. Genéricamente se las denomina *glucogenosis* y se caracterizan por acúmulo de cantidades anormalmente elevadas de glucógeno en tejidos, o por la presencia de glucógeno de estructura anómala.

Se han descripto catorce tipos de glucogenosis debidas a deficiencias de diferentes enzimas. Se describió primero la *enfermedad de von Gierke* o glucogenosis tipo I, caracterizada por depósitos excesivos de glucógeno en hígado y riñón. El glucógeno se sintetiza normalmente, pero hay una falla en la glucogenólisis que impide la liberación de glucosa a partir de estos depósitos. Hay ausencia o disminución de glucosa-6-fosfatasa en hígado y riñón.

En las glucogenosis tipo II y V a X está también afectada la glucogenólisis y se produce incremento del depósito de glucógeno en diferentes órganos. La enfermedad de McArdle o glucogenosis tipo V da lugar a aumento de glucógeno en músculos esqueléticos, con notable disminución de la capacidad de trabajo del músculo; no hay aumento de lactato en sangre después del ejercicio. Existe deficiencia o falta total de actividad fosforilasa en músculo. La fosforilasa hepática no está alterada, lo cual prueba el control genético independiente de las enzimas de hígado y músculo.

En todos los casos mencionados, la estructura de la molécula del polisacárido es normal. En cambio, hay otros cuadros en los cuales se encuentra glucógeno anormal. En el tipo III, debido a deficiencia de enzima desramificante, aumenta el depósito de glucógeno con ramificaciones externas muy cortas. El tipo IV, o enfermedad de Andersen, es producido por incapacidad para sintetizar enzima ramificante; en ella el glucógeno posee cadenas externas excesivamente largas y muy poco ramificadas.

En general, estos cuadros patológicos son de incidencia poco frecuente, pero es importante conocer su existencia para sospecharlos cuando se presentan y derivar los pacientes a centros especializados. Algunos de ellos son muy graves, llevan a la muerte a edad temprana; otros permiten una mayor sobrevida. La tabla 14-1 presenta un resumen de las glucogenosis.

GLUCÓLISIS

La principal vía del catabolismo de glucosa es la serie de reacciones llamada *glucólisis* o *vía de Embden-Meyerhof*. En el curso de esta vía, una molécula de glucosa es desdoblada en dos de piruvato y se produce energía utilizable. El proceso puede cumplirse en ausencia de oxígeno (anaerobiosis).

Este mecanismo metabólico proveedor de energía es evolutivamente el más antiguo, quizás utilizado por los primeros seres vivos que aparecieron en la Tierra cuando la atmósfera estaba desprovista de oxígeno. La glucólisis es también un notable ejemplo de la unidad del mundo biológico; funciona en todos los organismos vivientes, aun filogenéticamente muy distantes, siguiendo exactamente las mismas etapas. En distintas especies puede variar el destino final del piruvato formado. Muchos microorganismos realizan por esta vía la degradación anaeróbica de glucosa y otros monosacáridos; el proceso es denominado *fermentación*. Los productos terminales difieren en distintos microorganismos. Algunos forman lactato (fermentación láctica), otros producen etanol y CO_2 (fermentación alcohólica), otros ácido acético.

En seres aerobios, la glucólisis constituye la primera parte del catabolismo de glucosa. En ellos el piruvato continúa su degradación por vía oxidativa hasta CO_2 y H_2O. Sin embargo, en organismos aerobios cuando un tejido funciona con insuficiente provisión de oxígeno, por ejemplo en el músculo esquelético durante un ejercicio brusco e intenso, el piruvato es convertido en lactato como en la fermentación láctica.

Las transformaciones químicas de la glucólisis comprenden cambios en la molécula del sustrato original (glucosa) con producción de metabolitos ricos en energía, que pueden transferir restos fosforilo a ADP. Esta capacidad de generar ATP por mecanismos de *fosforilación a nivel de sustrato*, sin participación de oxígeno ni cadena respiratoria, otorga importancia fisiológica a la glucólisis.

La serie de reacciones de la glucólisis puede dividirse en dos fases. En la primera, la hexosa sufre dos fosforilaciones y termina dividida en dos triosas-fosfato. Es ésta una fase preparatoria, durante la cual se invierte energía para formar compuestos incapaces de escapar de la célula y más reactivos que la glucosa, es decir, más aptos para sufrir nuevas transformaciones. El resultado del primer grupo de reacciones es la ruptura de la molécula inicial de seis carbonos en dos de tres carbonos, gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y dihidroxiacetonafosfato (DHAP). Esta última es transformada en G3P, razón por la cual puede considerarse que cada molécula de glucosa ingresada en la vía se convierte en dos de G3P.

En la segunda parte, el gliceraldehído-3-fosfato sufre oxidación y redistribución de sus átomos con formación de intermediarios de alta energía que participan en la síntesis de ATP por *fosforilación a nivel de sustrato*. En esta fase se obtiene el rédito energético de la vía.

Tabla 14-1. Glucogenosis.

Tipo	*Enfermedad*	*Enzima deficiente*	*Síntomas*
0		Glucógeno sintasa	Hipoglucemia, cetonemia, retardo del crecimiento, muerte temprana.
Ia	Von Gierke	Glucosa-6-fosfatasa	Acumulación de glucógeno en hígado y riñón, hipoglucemia, cetonemia, acidosis láctica, hiperlipemia, hiperuricemia.
Ib		Glucosa-6-P translocasa microsomal	Igual a Ia, susceptibilidad a infecciones.
Ic		Transportador de P_i microsomal	Igual a Ia.
II	Pompe	α-(1,4)-glucosidasa lisosomal	Acumulación de glucógeno en lisosomas, glucemia normal, afecta principalmente a músculos esquelético y cardíaco.
IIIa	Cori o Forbes	Desramificante	Hepatomegalia, miopatía.
IIIb		Desramificante sólo en hígado	Hepatomegalia.
IV	Andersen o Amilopectinosis	Ramificante	Hepato-esplenomegalia, mioglobinuria, muerte temprana.
V	McArdle	Fosforilasa de músculo	Acumulación de glucógeno en músculo, debilidad muscular, calambres, escasa producción de lactato durante el ejercicio.
VI	Hers	Fosforilasa de hígado	Acumulación de glucógeno en hígado, hepatomegalia, hipoglucemia y cetosis leve.
VIb, VIII, IX		Fosforilasa quinasa	Hepatomegalia.
VII	Tarui	Fosfofructoquinasa de músculo y eritrocitos	Igual a V más hemólisis.
X		Proteína quinasa A de hígado	Hepatomegalia.
XI	Fanconi-Bickel	Transportador de glucosa (GLUT2)	Hepatomegalia, retardo de crecimiento, raquitismo, disfunción renal.
XII		Enolasa	Mialgia, mioglobinuria, debilidad muscular.
XIII		Fosfoglucomutasa	Dolor muscular al esfuerzo, necrosis muscular, Mioglobinuria.

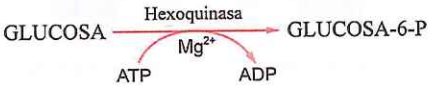
Nota: Todas, excepto tipo 0, presentan aumento del depósito de glucógeno. Existen varios subtipos de la enfermedad de Hers (tipo VI) debidos a diferentes mutaciones.

Todas las enzimas involucradas se encuentran en el citosol, razón por la cual la glucólisis se cumple íntegramente en el citoplasma de las células.

Primera fase de la glucólisis

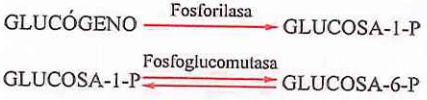
1. **Formación de glucosa-6-fosfato.** La utilización de glucosa exige, como etapa inicial obligatoria, su fosforilación en el carbono 6. Las reacciones necesarias para obtener G-6-P son distintas si la "materia prima" utilizada por el tejido es glucosa o glucógeno.

Como ya se ha indicado, a partir de glucosa la fosforilación es catalizada por *hexoquinasas*. Gracias a la gran afinidad por el sustrato de las isozimas I a III, la utilización de glucosa en tejidos extrahepáticos no es afectada por las oscilaciones habituales de la glucemia. En hígado, la isozima IV o *glucoquinasa*, de baja afinidad, sólo actúa cuando los niveles de glucosa son elevados. La reacción es irreversible en las condiciones reinantes en la célula.



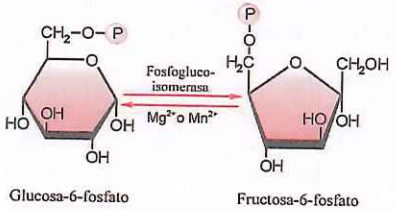
Cuando se parte de glucógeno, la degradación hasta glucosa-6-fosfato se cumple en dos etapas,

catalizadas sucesivamente por *fosforilasa* y *fosfoglucomutasa* (ver pág. 259).

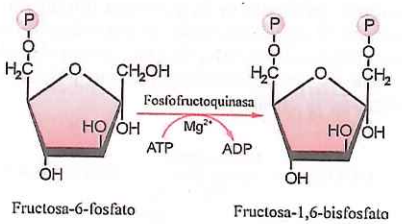


A partir de G-6-P la vía glucolítica continúa con las siguientes reacciones:

2. **Formación de fructosa-6-fosfato.** Por un proceso de isomerización, la glucosa-6-fosfato es convertida en fructosa-6-fosfato (F-6-P). La reacción, fácilmente reversible, es catalizada en ambos sentidos por *fosfoglucoisomerasa*, enzima que requiere iones Mg^{2+} o Mn^{2+}. La fosfoglucoisomerasa es una molécula multifuncional y además de participar en el metabolismo de hidratos de carbono, es liberada por neuronas, células musculares y renales para actuar como citoquina o factor neurotrófico que favorece la diferenciación de neuronas. También es secretada por células cancerosas, en las que estimula metastasis. Mutaciones en el gen que codifica esta enzima se asocian a anemia hemolítica esferocítica.

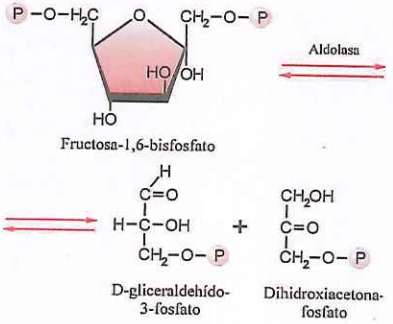


3. **Fosforilación de fructosa-6-fosfato.** La fructosa-6-fosfato es fosforilada en el carbono 1 y se transforma en fructosa-1,6-bisfosfato (F-1,6-bisP). La reacción exige la transferencia de un grupo fosforilo cedido por ATP. Cataliza esta transformación la *fosfofructoquinasa*, en presencia de iones Mg^{2+}.



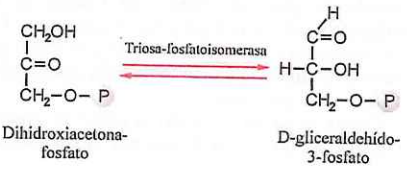
El acoplamiento con la hidrólisis de ATP hace posible la síntesis del éster fosfórico en carbono 1. La reacción, esencialmente irreversible, es muy importante en la regulación de esta vía metabólica. La fosfofructoquinasa es una enzima alostérica cuya actividad es modulada por distintos efectores. Es activada por AMP, ADP y fructosa-2,6-bisfosfato, e inhibida por ATP y citrato. Fallas en el gen de fosfofructoquinasa causan la enfermedad de Tarui o glucogenosis VII (Tabla 14-1).

4. **Formación de triosas-fosfato.** Fructosa-1,6-bisfosfato es escindida en dos triosas fosfato, gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y dihidroxiacetonafosfato (DHAP). La reacción es catalizada en ambos sentidos por una liasa, la *aldolasa*. Hay tres isozimas de aldolasa, la A se expresa en músculo, la B en hígado, riñón, estómago e intestino y la C en cerebro, corazón y ovario. Las A y C están principalmente comprometidas solo en glucólisis, y la B funciona en el metabolismo de fructosa. Defectos en el gen que codifica aldolasa B resultan en intolerancia hereditaria a la fructosa.



Aunque la reacción de ruptura de fructosa-1,6-bisfosfato es endergónica, con un $\Delta G^{\circ\prime}$ positivo, transcurre con toda facilidad porque los productos (triosas-fosfato) son eliminados rápidamente por las reacciones siguientes.

5. **Interconversión de triosas-fosfato.** De las dos triosas-fosfato producidas en la reacción anterior, sólo D-gliceraldehído-3-fosfato continúa directamente la vía metabólica. La DHAP también sigue el camino de la glucólisis, pero para ello debe ser transformada en G3P. Esto es posible gracias a la conversión reversible de las triosas por acción de *triosa-fosfato isomerasa*.

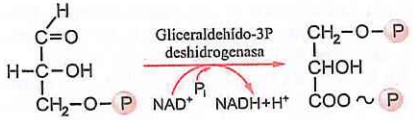


Si bien el equilibrio de la reacción está fuertemente desplazado hacia la izquierda, en los tejidos marcha predominantemente de izquierda a derecha debido a la continua sustracción de G3P por la etapa siguiente. Deficiencias de triosafosfato isomerasa causan anemia hemolítica y trastornos neurológicos severos.

Segunda fase de la glucólisis

En la reacción anterior, la dihidroxiacetona fosfato se convierte en D-gliceraldehído-3-fosfato. Por esta razón, se considera que cada molécula de glucosa da lugar a dos moléculas de G3P.

6. **Oxidación y fosforilación del gliceraldehído-3-fosfato.** Es una etapa de gran importancia en la glucólisis. En ella se produce deshidrogenación del gliceraldehído. La energía liberada es utilizada para introducir fosfato (P_i) del medio y formar 1,3-bisfosfoglicerato. La reacción es catalizada por *gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa* (G3PDH), oxidorreductasa que utiliza NAD como coenzima.

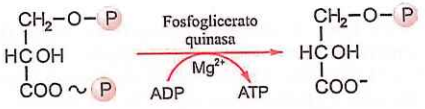


D-gliceraldehído-3-fosfato — 1,3-bisfosfoglicerato

El mecanismo de la reacción ha sido muy bien estudiado. El gliceraldehído-3-fosfato se une a un grupo sulfhidrilo esencial en el sitio activo de la enzima y es oxidado a ácido glicérico-3-fosfato. Luego se introduce un fosfato y se libera 1,3-bisfosfoglicerato, fosfato de acilo con elevada energía de hidrólisis.

Además de estar presente en el citosol, G3PDH puede trasladarse al núcleo celular donde, al unirse a ADN regula genes que interfieren con en el sistema de señales de muerte celular programada o apoptosis. Esto es particularmente importante en neuronas, por lo que alteraciones de G3PDH se relacionan con la aparición de enfermedades neurodegenerativas (Huntington, Parkinson, Alzheimer).

7. **Fosforilación a nivel de sustrato.** El fosfato de alta energía es transferido de 1,3-bisfosfoglicerato a ADP, por acción de *fosfogliceratoquinasa;* se produce 3-fosfoglicerato y ATP.

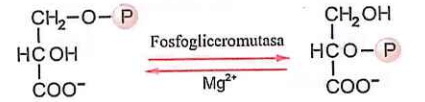


1,3-bisfosfoglicerato — 3-fosfoglicerato

Deficiencias de fosfogliceratoquinasa se asocian a anemia hemolítica, miopatía, trastornos del sistema nervioso central y retardo del crecimiento.

Las reacciones (6) y (7) sumadas resultan reversibles en las condiciones de la célula. El potencial de transferencia de fosforilo del fosfato de acilo permite la formación de ATP. Es ésta una *fosforilación a nivel de sustrato* y la primera reacción de la glucólisis en la cual hay conservación de energía.

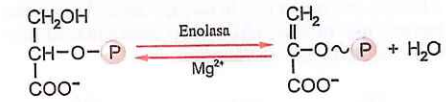
8. **Formación de 2-fosfoglicerato.** El 3-fosfoglicerato es convertido en 2-fosfoglicerato por transferencia intramolecular del fosforilo. Esta reacción es catalizada, en ambos sentidos, por *fosfoglicerato mutasa* en presencia de Mg^{2+}.



3-fosfoglicerato — 2-fosfoglicerato

Defectos genéticos de fosfoglicerato mutasa son causa de alteraciones musculares, estos pacientes presentan intolerancia al ejercicio.

9. **Formación de fosfoenolpiruvato.** Se produce una deshidratación y redistribución intramolecular en el 2-fosfoglicerato para generar un compuesto rico en energía, el fosfoenolpiruvato. Cataliza esta reacción reversible la *enolasa,* que requiere Mg^{2+} o Mn^{2+}.

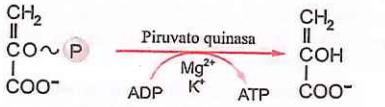


2-fosfoglicerato — Fosfoenolpiruvato

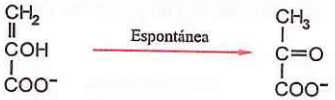
La pérdida de una molécula de agua produce tal redistribución de la energía del 2-fosfoglicerato, que el enlace fosfato en fosfoenolpiruvato adquiere elevada energía libre de hidrólisis. La enolasa presenta tres isoformas, α se encuentra en casi todos los tejidos, β en músculo y γ solo en tejido nervioso. La isozima de sistema nervioso se libera y su nivel aumenta en el plasma en varias enfermedades neurológicas, como di-

versos tipos de tumores, alteraciones serias del sistema nervioso, esclerosis múltiple y después de convulsiones. La deficiencia de enolasa β está asociada a glucogenosis tipo XII. La enolasa es fuertemente inhibida por fluoruro.

10. **Segunda fosforilación a nivel de sustrato.** El fosfoenolpiruvato tiene potencial de transferencia suficiente para ceder fosfato a ADP y formar ATP. La reacción es catalizada por *piruvato quinasa* y necesita iones Mg^{2+} o Mn^{2+}. El catión K^+ tiene un efecto activador sobre esta enzima. El enolpiruvato resultante se transforma espontáneamente en piruvato.



Fosfoenolpiruvato — Enolpiruvato



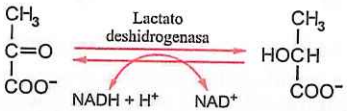
Enolpiruvato — Piruvato

Se ha generado otra molécula de ATP por fosforilación a nivel de sustrato.

Existen cuatro isoenzimas de piruvato quinasa, L en hígado, R en eritrocitos, M1 en músculo, corazón y cerebro y M2 en tejidos fetales.

11. **Formación de lactato.** El piruvato formado puede seguir distintos caminos. En otra sección se tratará su degradación en condiciones de aerobiosis.

Cuando la disponibilidad de oxígeno es escasa o nula (anaerobiosis), el piruvato es reducido a lactato por acción de la *lactato deshidrogenasa*, enzima que utiliza NAD como coenzima. El proceso es fácilmente reversible.



Piruvato — Lactato

La reacción catalizada por lactato deshidrogenasa tiene gran importancia funcional. En ausencia o deficiencia de oxígeno, el NADH formado durante la oxidación de gliceraldehído-3-fosfato (reacción 6) no puede oxidarse a NAD cediendo sus equivalentes de reducción a la cadena respiratoria, pues ésta no funciona (en aerobiosis, esa transferencia se realiza por vía indirecta, a través de lanzaderas, pág. 185). La glucólisis está limitada por la disponibilidad de NAD; se detiene cuando todo el NAD existente en el citosol se reduce a NADH. La conversión de piruvato en lactato es un mecanismo que asegura la reoxidación del NADH y permite el funcionamiento sostenido de la glucólisis.

Esta reacción explica por qué el lactato es el producto final de la glucólisis en tejidos que funcionan en relativa anaerobiosis, por ejemplo, el músculo esquelético durante ejercicio intenso.

La figura 14-5 presenta un resumen de las reacciones de la vía glucolítica.

Balance energético de la glucólisis

Cada mol de glucosa ingresado en la vía da origen a dos moles de triosa fosfato y finalmente se convierte en dos moles de lactato.

Hay dos etapas en las cuales se consume ATP. Un mol de glucosa requiere uno de ATP en la fosforilación inicial para formar G-6-P y otro mol en la segunda fosforilación de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-bisfosfato. Cuando se parte de glucógeno no se consume ATP en la fosforilación inicial.

En la segunda fase de la glucólisis, dos etapas producen ATP por fosforilación a nivel de sustrato. Son las reacciones catalizadas por fosfoglicerato-quinasa y piruvatoquinasa. Cada mol de 1,3-bisfosfoglicerato genera uno de ATP a partir de ADP y cada mol de fosfoenolpiruvato engendra otro de ATP. Por lo tanto, como una glucosa da lugar a dos triosas fosfato, el rendimiento por mol de glucosa es de cuatro moles de ATP. El balance final de la glucólisis es una ganancia neta de dos moles de ATP por mol de glucosa utilizado (tabla 14-2).

Tabla 14-2. Balance energético de la glucólisis.

GASTO DE ATP (Por mol de glucosa)	
Glucosa → Glucosa-6-fosfato	– 1 mol ATP
Fructosa-6-P → Fructosa-1,6-bisP	– 1 mol ATP
PRODUCCIÓN DE ATP (Por mol de glucosa)	
1,3-bisfosfoglicerato → 3-bisfosfoglicerato	+ 2 mol ATP
Fosfoenol piruvato → Piruvato	+ 2 mol ATP
Balance total	+ 2 mol ATP

La hidrólisis de un mol de ATP a ADP cede aproximadamente 7,3 kcal (30,5 kJ) en condicio-

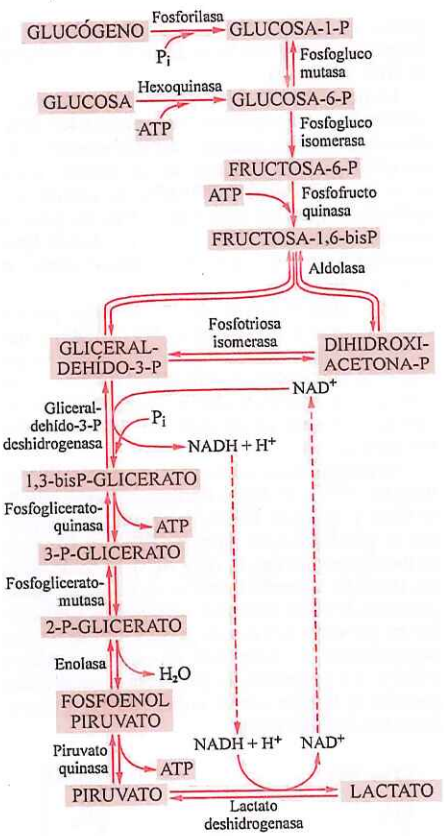


Fig. 14-5. Vía glucolítica o de Embden-Meyerhof.

nes estándar. El rendimiento energético de la glucólisis por mol de glucosa es de 14,6 kcal (61 kJ) Si se tiene en cuenta que el total de energía contenida en la glucosa es 686 kcal/mol (2.870 kJ/mol), el rendimiento logrado por la glucólisis es ínfimo. Sin embargo, para medir la eficiencia de esta vía, es necesario tener en cuenta que las dos moléculas de lactato formadas como producto final contienen todavía más del 90% de la energía original de la glucosa, que puede aprovecharse durante la oxidación total a CO_2 y H_2O. La glucólisis es un mecanismo dispuesto para obtener energía de la glucosa sin recurrir a su oxidación y, en este sentido, es altamente eficaz. Gracias a ella se produce energía para la contracción muscular y otros procesos sin consumir significativamente el potencial energético del sustrato.

El lactato generado en los músculos durante el ejercicio pasa a la sangre y puede ser reconvertido en glucosa en hígado, u oxidado completamente en otros tejidos, lo cual permite utilizar la energía aún contenida en su molécula, poco inferior a la existente en la glucosa original.

Papel funcional de la glucólisis

Si bien la glucólisis es la principal vía inicial de utilización de glucosa en todos los tejidos, en algunos tiene significación especial.

Músculo esquelético. La glucólisis es la vía de generación del ATP requerido por la contracción muscular durante ejercicios intensos. En períodos de reposo o de actividad ligera el tejido recurre a vías oxidativas con gran rendimiento de ATP, pero en las condiciones de relativa anaerobiosis reinantes durante la actividad intensa, la más importante vía proveedora de energía es la glucólisis.

Tejido adiposo. Una de las principales funciones de la glucólisis en este tejido, especializado en el almacenamiento de triacilglicéridos, es proveer dihidroxiacetonafosfato, precursora del glicerolfosfato utilizado en la síntesis de esos compuestos.

Glóbulos rojos. No tienen mitocondrias y no pueden generar ATP por vías oxidativas. Dependen enteramente de la glucólisis para la síntesis de ATP. El 2,3-bisfosfoglicerato, importante modulador de hemoglobina, se genera a partir de un intermediario de la glucólisis, el 1,3-bisfosfoglicerato.

Irreversibilidad de la glucólisis

En la glucólisis se acoplan procesos exergónicos y endergónicos. El resultado final es la conversión de una molécula de glucosa en dos de ácido láctico:

$$\text{GLUCOSA} \longrightarrow 2\ \text{LACTATO} + 2\ H^+$$

El cambio de energía libre para este proceso es francamente negativo ($\Delta G^{\circ\prime} = -47{,}0$ kcal/ mol o $-196{,}6$ kJ/mol,). Por otro lado, el rédito neto es la formación de dos enlaces de alta energía, lo cual puede expresarse en la ecuación:

$$2\ \text{ADP} + 2\ P_i \longrightarrow 2\ \text{ATP} + 2\ H_2O$$

Es éste un proceso endergónico, con un $\Delta G^{\circ\prime}$ de +14,6 kcal/mol (+61 kJ/mol).

La suma de las reacciones indicadas arriba da la ecuación total de la glucólisis:

$$\text{GLUCOSA} + 2\ \text{ADP} + 2\ P_i \longrightarrow 2\ \text{LACTATO} + 2\ H^+ + 2\ \text{ATP} + 2\ H_2O$$

cuyo cambio de energía libre es:

$$\Delta G^{\circ\prime} = -196{,}6 + 61 = -135{,}6\ \text{kJ/mol}$$

El proceso total transcurre con marcada disminución de energía libre, lo cual hace de la glucólisis, en condiciones fisiológicas, una vía metabólica irreversible.

En la secuencia de reacciones descripta, tres de ellas, marcadamente exergónicas, determinan el sentido unidireccional de la vía de Embden-Meyerhof. Corresponden a las reacciones catalizadas por hexoquinasa, fosfofructoquinasa y piruvatoquinasa.

En el hígado y en otros órganos, en los cuales el lactato puede recorrer el camino de vuelta para formar glucosa, esas etapas irreversibles se cumplen en sentido opuesto utilizando mecanismos y enzimas diferentes de las indicadas para la glucólisis (véase gluconeogénesis, pág. 277).

Función anabólica de la glucólisis. Si bien la glucólisis es una vía esencialmente catabólica, genera metabolitos utilizados para diversas síntesis, entre ellos a) dihidroxiacetonafosfato, a partir de la cual se forma glicerol-3-fosfato, intermediario en la síntesis de triacilgliceroles y fosfolípidos; b) 1,3-bisfosfoglicerato, precursor de 2,3-bisfosfoglicerato, modulador de hemoglobina; c) piruvato, convertible en alanina por transaminación.

DESCARBOXILACIÓN OXIDATIVA DEL PIRUVATO

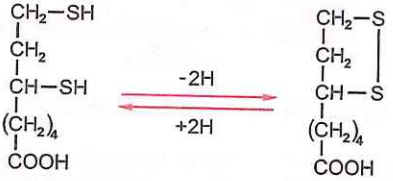
Cuando existe adecuada provisión de oxígeno, el piruvato producido en la vía glucolítica es oxidado a dióxido de carbono y agua. Incluso el lactato formado en anaerobiosis sigue el mismo destino cuando hay disponibilidad de oxígeno; para ello debe ser convertido en piruvato por acción de la lactato deshidrogenasa. De esta manera el lactato resultante de la actividad muscular intensa puede ser utilizado como combustible.

El piruvato formado en el citosol como producto de la vía de Embden-Meyerhof es degradado oxidativamente dentro de las mitocondrias. Para ello atraviesa la membrana interna de estas organelas gracias a un transportador que lo introduce en la matriz. Aquí se cumple el primer paso de su degradación por descarboxilación oxidativa, en la cual pierde el grupo carboxilo, se desprende CO_2 y queda un resto de dos carbonos (acetilo o acetato).

La descarboxilación oxidativa de piruvato es catalizada por un sistema multienzimático denominado *complejo piruvato deshidrogenasa*. Este complejo es una voluminosa agrupación molecular de alrededor de 7.000 kDa, constituida por múltiples copias de cada una de tres enzimas: a) *piruvato descarboxilasa* o E1, b) *dihidrolipoil transacetilasa* o E2 y c) *dihidrolipoil deshidrogenasa* o E3.

Los intermediarios de la reacción permanecen unidos a las enzimas del complejo, que están ordenadas de modo que el sustrato va pasando de una a otra sin difundir al medio, lo que asegura un funcionamiento muy eficiente del sistema. Es éste un ejemplo de "canalización" del sustrato.

Participan cinco coenzimas: a) pirofosfato de tiamina (PPT), b) ácido lipoico, c) coenzima A, d) FAD y e) NAD. De las coenzimas participantes, el pirofosfato de tiamina (PPT) es derivado de tiamina o vitamina B_1 (pág. 585). El ácido lipoico, también llamado tióctico, es un ácido graso saturado de ocho carbonos, con grupos sulfhidrilos en carbonos 6 y 8. Los grupos -SH se oxidan reversiblemente, formando un puente disulfuro (-S-S-). La presencia de los grupos sulfhidrilos permite al lipoato actuar como aceptor y transportador de hidrógenos.



Acido lipoico (reducido) — Acido lipoico (oxidado)

La coenzima A (CoA) posee estructura nucleotídica. Está constituida por adenina, ribosa, dos restos fosfato, un resto ácido pantoténico (vitamina del complejo B) y β-mercaptoetilamina (ver ácido pantoténico, pág. 591). La coenzima A actúa como aceptora y transportadora de restos acilo, unidos a ella por enlace tioéster, de gran energía libre de hidrólisis.

Las coenzimas FAD y NAD han sido presentadas en el capítulo 9.

También forman parte del complejo una proteína quinasa y una fosfoproteína fosfatasa que tienen funciones de regulación.

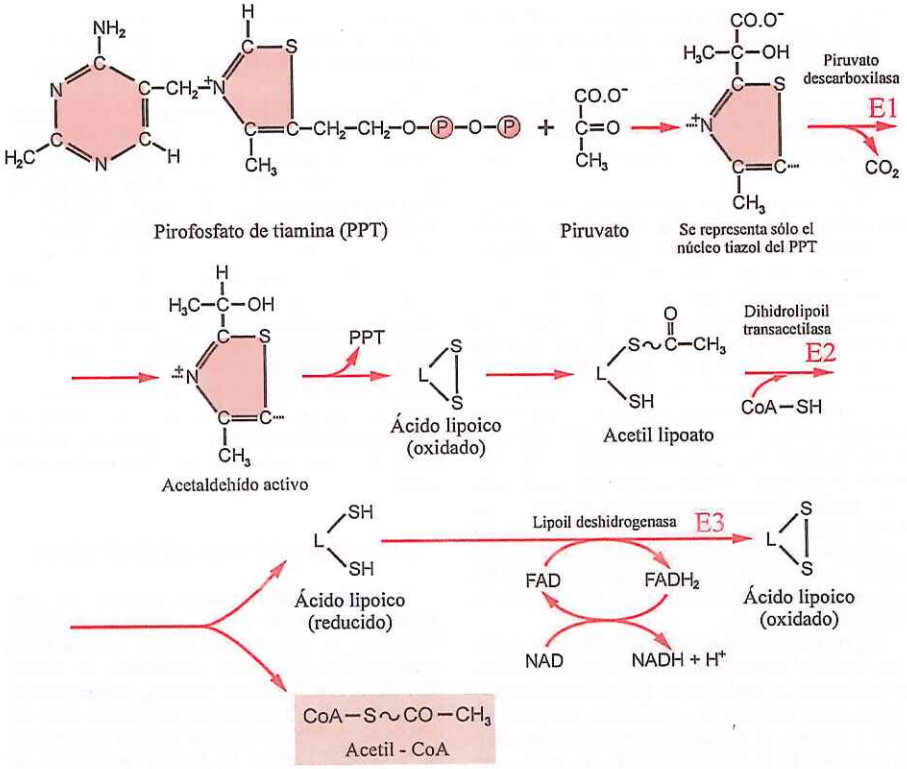
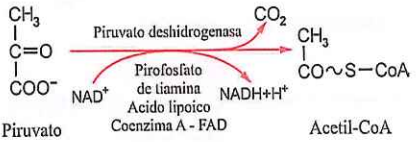


Fig. 14-6. Etapas de la descarboxilación oxidativa del piruvato.

El proceso puede resumirse en la siguiente ecuación total:



La reacción es compleja; se cumple en varias etapas (fig. 14-6): 1) Por acción de la enzima E1 (piruvato descarboxilasa) el piruvato pierde su grupo carboxilo y se desprende CO_2. La coenzima PPT, firmemente unida a E1, actúa como aceptora y transportadora del resto de dos carbonos. 2) Las dos reacciones siguientes son catalizadas por E2 (dihidrolipoil transacetilasa). El residuo de dos C se oxida a acetato por pérdida de dos H que son captados por el ácido lipoico. A continuación el acetato es transferido a la CoA y se forma acetil-CoA. 3) E3 (dihidrolipoil deshidrogenasa), oxidorreductasa ligada a FAD, capta los H del dihidrolipoato para regenerar el lipoato. Finalmente el $FADH_2$ cede los equivalentes de reducción a NAD^+ y se libera al medio $NADH + H^+$. El proceso es *irreversible* en condiciones fisiológicas (fig. 14-6).

El complejo piruvato deshidrogenasa es un importante sitio de regulación. Su actividad es modulada por diferentes metabolitos y por modificación covalente (fosforilación-desfosforilación).

El resto de dos carbonos resultante de la descarboxilación de piruvato queda unido por enlace tioéster de alta energía a coenzima A; forma acetil-CoA, también llamado "*acetato activo*". El acetilo adquiere gran reactividad y participa en transformaciones químicas. El NAD reducido ($NADH + H^+$) generado en la reacción cede sus

hidrógenos a la cadena respiratoria, donde finalmente se unen con oxígeno para formar agua.

Dos hidrógenos transferidos en la cadena respiratoria desde NAD generan entre 2,5 y 3 moléculas de ATP a partir de ADP (para simplificar los cálculos, consideraremos que la descarboxilación oxidativa de un mol de piruvato produce 3 moles de ATP).

El piruvato es una encrucijada. Su descarboxilación es la alternativa metabólica más importante en condiciones de provisión adecuada de oxígeno. La actividad del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) es reducida o nula en diferentes condiciones, ya sean genéticas, que afectan la síntesis de componentes del sistema, o adquiridas. Deficiencias adquiridas de PDH se observan en el alcoholismo crónico, la avitaminosis B_1 (falta de tiamina) o envenenamiento con arsenito o compuestos mercuriales, que inactivan PDH. En todos los casos el resultado es acumulación de piruvato, el cual es derivado hacia otras vías, principalmente reducción a lactato y, en menor proporción, transaminación a alanina. La producción incrementada de lactato da el cuadro clínico de *acidosis láctica*. Se observa también acidosis láctica cuando el aporte de oxígeno es insuficiente (hipoxia).

Existe una deficiencia de E1 debida a mutación ligada al cromosoma X. Cuando la ausencia de la enzima es total, no se forma acetil-CoA y los pacientes mueren al nacer. Si la actividad es 25% o mayor, el cuadro es menos severo, hay disminución en la síntesis de ATP y acumulación de ácido láctico; los síntomas más llamativos son trastornos psicomotores. En estos casos, un tratamiento paliativo puede ser una dieta cetogénica, alta en proteínas y grasas, cuya degradación produce acetil-CoA, que se oxida en el ciclo del ácido cítrico con producción de ATP. Las fallas en el gen de E3 afectan también a la misma enzima de los complejos de deshidrogenasas de α-ceto glutarato y α-cetoácidos de cadena ramificada.

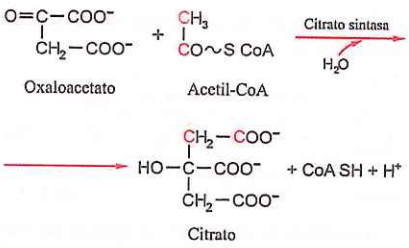
CICLO DEL ÁCIDO CÍTRICO, DE ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS O DE KREBS

El acetil-coenzima A o acetato activo es intermediario "clave" en el metabolismo oxidativo y también en la síntesis de muchos constituyentes de la célula. Este intermediario no sólo se forma por descarboxilación de piruvato, sino también por oxidación de ácidos grasos y de la cadena carbonada de aminoácidos. Además, este resto de dos carbonos es utilizado para síntesis de colesterol, ácidos grasos y otros compuestos. El acetato activo es una importantísima encrucijada metabólica en la cual convergen numerosas vías.

El resto acetilo es oxidado en las células hasta CO_2 y H_2O a través de un ciclo metabólico propuesto en la década del 30 por Hans Krebs, uno de los más destacados bioquímicos del siglo XX. Esta vía es conocida por los nombres de ciclo de Krebs, o del ácido cítrico, o de ácidos tricarboxílicos y se cumple íntegramente dentro de las mitocondrias. Comprende una serie de reacciones en la cual se produce oxidación total de restos acetato procedentes de muy distintos orígenes (glúcidos, lípidos, aminoácidos). El acetil-CoA actúa como "alimentador" del ciclo e inicia las reacciones combinándose con oxaloacetato. Al final se regenera oxaloacetato, compuesto que funciona catalíticamente en la oxidación del resto acetilo a dos moléculas de CO_2 (productos del ciclo).

Reacciones del ciclo del ácido cítrico

1. **Formación de ácido cítrico.** La condensación del resto de dos carbonos de acetil-coenzima A con oxaloacetato, intermediario dicarboxílico de cuatro carbonos, da citrato (forma iónica del ácido cítrico), compuesto de seis carbonos y tres grupos carboxilo. Esta reacción es catalizada por una enzima condensante, la *citrato sintasa*. El estado "activado" del resto acetilo permite la formación de una unión carbono-carbono entre el metilo del acetato y el carbonilo del oxaloacetato.

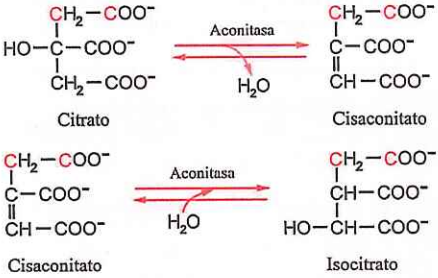


Los carbonos en rojo son los pertenecientes al resto acetilo.

Debido a la hidrólisis exergónica del enlace tioéster de acetil-CoA, la reacción está fuertemente desplazada hacia la formación de citrato y es esencialmente irreversible. La citrato sintasa es regulatoria, inhibida por ATP.

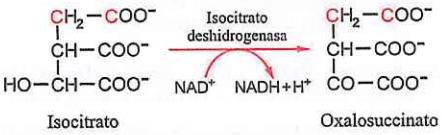
2. **Formación de isocitrato.** Por un proceso de isomerización, el citrato se convierte en iso-

citrato en dos pasos. Primero se deshidrata a cisaconitato, luego recupera agua y forma isocitrato. Ambas etapas son catalizadas por la misma enzima, la *aconitasa*.



La aconitasa tiene un papel dual, funciona como enzima o como modulador de la actividad génica. Posee un núcleo hierro-azufre que cuando pierde Fe deja de ser un catalizador y actúa como proteína regulatoria (IRP1), que influye en la síntesis de proteínas involucradas en la homeostasis del hierro.

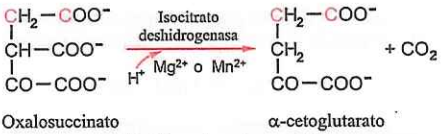
3. **Oxidación de isocitrato.** El isocitrato experimenta una deshidrogenación para convertirse en oxalosuccinato. Cataliza esta reacción la *isocitrato deshidrogenasa*, oxidorreductasa que utiliza NAD como coenzima y requiere Mg^{2+} o Mn^{2+}. Es una enzima alostérica; su afinidad por el sustrato es aumentada por ADP, mientras ATP y NADH tienen efecto inhibitorio. Se considera a esta etapa como el principal sitio de regulación del funcionamiento del ciclo.



En el citosol y también en la matriz mitocondrial existe otra isocitrato deshidrogenasa, no dependiente de NAD sino de NADP, que no está sujeta al mismo tipo de regulación.

Hasta aquí los intermediarios formados son compuestos con tres carboxilos en su molécula, razón del nombre con el cual suele llamarse a este ciclo.

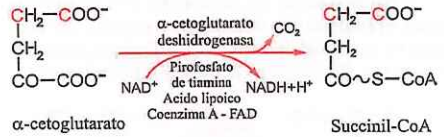
4. **Descarboxilación de oxalosuccinato.** La misma enzima responsable de la reacción anterior, la *isocitrato deshidrogenasa*, cataliza la descarboxilación de oxalosuccinato para dar α-cetoglutarato.



El carbono del CO_2 liberado en la reacción no corresponde a ninguno de los del acetilo que ingresó en la primera reacción del ciclo (representados en rojo).

En esta etapa se libera la primera molécula de dióxido de carbono y se origina un intermediario dicarboxílico de cinco carbonos.

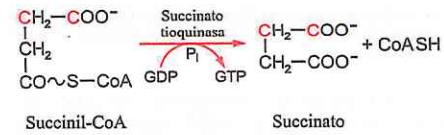
5. **Descarboxilación oxidativa de α-cetoglutarato.** La reacción es similar a la descripta para piruvato. El proceso es catalizado por un sistema multienzimático llamado *complejo α-cetoglutarato deshidrogenasa*, formado por tres enzimas que requieren las coenzimas pirofosfato de tiamina, ácido lipoico, coenzima A, FAD y NAD. El mecanismo de la reacción es semejante al de descarboxilación de piruvato. Los productos de la reacción son CO_2, NADH, H^+ y succinil-SCoA. Este último es un resto dicarboxílico de cuatro carbonos unido a coenzima A por enlace tioéster de alta energía. En resumen, la reacción puede representarse así:



El carbono del CO_2 liberado en la reacción no corresponde a ninguno de los del acetilo ingresado en la primera reacción del ciclo (representados en rojo).

La reacción es fuertemente exergónica y prácticamente irreversible.

6. **Formación de succinato.** La succinil-coenzima A es convertida en succinato y CoA libres por acción de *succinato tioquinasa*. Esta reacción requiere guanosina difosfato (GDP) y fosfato inorgánico (P_i). La energía contenida en la unión tioéster es utilizada para transferir fosfato a GDP y obtener guanosina trifosfato (GTP).

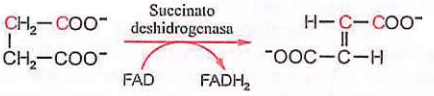


Es ésta la única etapa del ciclo en la cual se genera una unión fosfato de alta energía a nivel de sustrato.

A partir de GTP se puede formar ATP, en reacción catalizada por *nucleósido difosfato quinasa*:

$$GTP + ADP \rightleftharpoons GDP + ATP$$

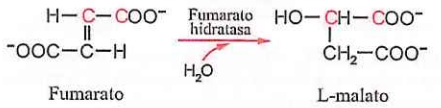
7. **Deshidrogenación de succinato.** El succinato es oxidado a fumarato por acción de *succinato deshidrogenasa*, flavoproteína con FAD como aceptor de hidrógenos. La enzima tiene gran especificidad, produce sólo el isómero *trans* (fumarato). No se forma maleato, de configuración *cis*.



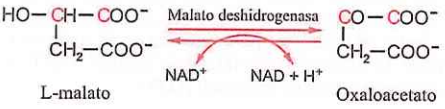
A diferencia de las otras enzimas que participan en el ciclo, todas las cuales se encuentran en la matriz mitocondrial, la succinato deshidrogenasa está firmemente unida a la membrana interna de la organela.

Esta enzima, pasible de regulación, es inhibida competitivamente por oxaloacetato, último (o primer) intermediario del ciclo.

8. **Hidratación de fumarato.** Por adición de agua, el fumarato se convierte en malato. La reacción es catalizada por una liasa llamada *fumarato hidratasa*. También se la denomina *fumarasa*.



9. **Oxidación de malato.** El malato pierde dos hidrógenos y se transforma en oxaloacetato. Cataliza la reacción la *malato deshidrogenasa*, dependiente de NAD.



Los carbonos pertenecientes al acetilo ingresado en la primera reacción del ciclo (en rojo) se conservan en el oxaloacetato.

Esta reacción es endergónica, con $\Delta G^{\circ\prime}$ positivo. Sin embargo, en condiciones fisiológicas, la continua utilización de oxaloacetato la impulsa hacia la derecha.

El ciclo se cierra con la formación de oxaloacetato, compuesto final e inicial de la serie de reacciones. Durante una vuelta completa se liberan dos moléculas de CO_2 y ocho átomos de hidrógeno. Tres pares de esos hidrógenos son cedidos a NAD y el par restante, a FAD. En la cadena respiratoria esos cuatro pares de hidrógeno formarán, uniéndose a oxígeno, cuatro moléculas de agua.

Tabla 14-3. Reacciones del ciclo del ácido cítrico.

1.	Acetil-SCoA + Oxaloacetato + H_2O ⟶ Citrato + CoASH + H^+
2.	Citrato ⟶ Cis-aconitato + H_2O ⟶ Isocitrato
3.	Isocitrato + NAD^+ ⟶ Oxalosuccinato + NADH + H^+
4.	Oxalosuccinato + H^+ ⟶ α-Cetoglutarato + CO_2
5.	α-Cetoglutarato + NAD^+ + CoASH ⟶ Succinil-SCoA + CO_2 + NAD + H^+
6.	Succinil-SCoA + GDP + P_i ⟶ Succinato + GTP + CoASH
7.	Succinato + FAD ⟶ Fumarato + $FADH_2$
8.	Fumarato + H_2O ⟶ L-Malato
9.	L-Malato + NAD^+ ⟶ Oxaloacetato + NADH + H^+

Mediante estudios con isótopos radiactivos se ha comprobado que los dos carbonos liberados en forma de CO_2 no pertenecen al acetato ingresado al ciclo en esa vuelta, sino al oxaloacetato. En ciclos siguientes se eliminarán los carbonos ingresados con el primer acetilo. De cualquier modo, los dos carbonos liberados mantienen el balance del ciclo y, a los efectos prácticos, se consideran producto de oxidación del acetato.

La figura 14-7 indica las etapas del ciclo. Las reacciones se resumen en la tabla 14-3.

La ecuación global resultante es:

$$\text{Acetil-SCoA} + 3NAD^+ + FAD + 2H_2O + GDP + P_i \longrightarrow 2CO_2 + 3NADH + 3H^+ + FADH_2 + CoASH + GTP$$

Defectos genéticos de enzimas del ciclo de ácido cítrico son raros. Mutaciones en cualquiera de los genes que codifican aconitasa, α-cetoglutarato deshidrogenasa (α-GDH), succinato deshidrogenasa (SDH) y fumarasa pueden producir trastornos. Las manifestaciones clínicas de defectos de alguna de esas enzimas son principalmente neurológicos, asociados o no a alteraciones musculares (encefalopatía, síndrome de Leigh, ver pág. 184), y acidosis láctica. La deficiencia de SDH causa también cardiomiopatía y tumores adrenales (feocromocitomas). Pacientes con falla en la fumarasa no presentan compromiso cardíaco sino desarrollo de tumores de músculo (leiomiomiomas). Los síntomas de defectos en fu-

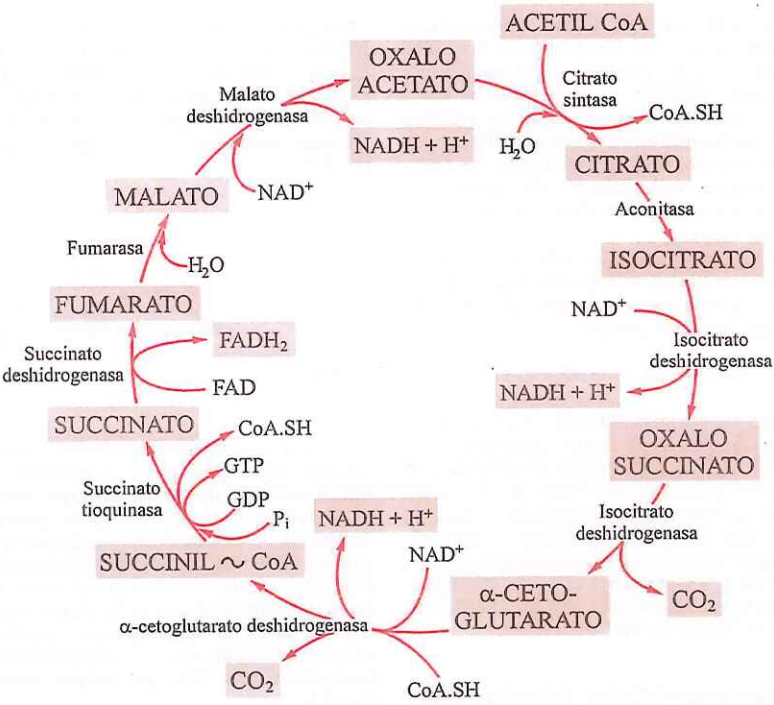


Fig. 14-7. Ciclo del ácido cítrico.

marasa y α-KGDH aparecen antes del año de edad. En cambio, los de SDH son observados después de varios años de vida, y hasta en adultos.

Consideraciones generales sobre el ciclo del ácido cítrico

La oxidación de malato (reacción 9) es muy endergónica; sin embargo, transcurre fácilmente en la dirección señalada gracias al rápido consumo de oxaloacetato en la reacción siguiente (1), que desplaza el equilibrio hacia la derecha. De esta manera, el acoplamiento de estas dos reacciones sucesivas determina el sentido del flujo de intermediarios.

La suma algebraica de los $\Delta G°'$ de todas las etapas da valor francamente negativo; el diseño termodinámico total del ciclo favorece su funcionamiento unidireccional. En este sentido, la reacción 1 (formación de citrato) y 5 (descarboxilación oxidativa de α-cetoglutarato), ambas fuertemente exergónicas, son las principales responsables de ese resultado final.

Como los intermediarios del ciclo se regeneran en cada vuelta, puede decirse que esta vía es autocatalítica, pues provee sus propios sustratos. Sin embargo, al analizar la ecuación total expuesta en la sección anterior, se comprueba la participación de una serie de compuestos no intermediarios, como acetil-SCoA, NAD, FAD, GDP, P_i y H_2O. La provisión de estos "alimentadores" es un aspecto crítico para el adecuado funcionamiento del ciclo.

No existen limitaciones en el abastecimiento de H_2O, P_i y acetil-SCoA, pues siempre abundan en la célula. El acetil-SCoA se produce no sólo a partir del piruvato formado en la glucólisis, sino también resulta de la degradación oxidativa de ácidos grasos, cadenas carbonadas de algunos aminoácidos y otras sustancias.

En cuanto a las coenzimas NAD^+ y FAD, reducidas en las reacciones 3, 5, 7 y 9, deben ser reoxidadas; el ciclo no puede continuar operando si la limitada cantidad de esas coenzimas existente en la mitocondria se reduce totalmente. Como NADH y $FADH_2$ ceden sus equiva-

lentes de reducción a la cadena respiratoria, es indispensable que ésta funcione para la normal operación del ciclo. Por eso esta vía metabólica es netamente aeróbica; no se cumple en anaerobiosis. La localización de todas las enzimas del ciclo en las mitocondrias es una disposición muy conveniente, pues de esta manera las coenzimas entregan fácilmente sus hidrógenos a la cadena de transporte electrónico incluida en la membrana interna.

El otro compuesto que debe proveerse es GDP. Este nucleósido difosforado se genera dentro de la mitocondria en reacción catalizada por *nucleósido difosfato quinasa*:

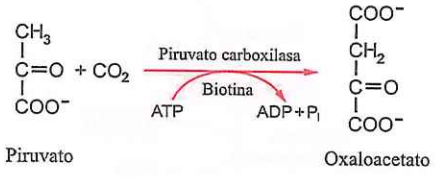
$$GTP + ADP \rightleftharpoons GDP + ATP$$

Si bien las enzimas del ciclo del ácido cítrico se encuentran en la matriz mitocondrial (a excepción de la succinato deshidrogenasa, que está inserta en la membrana interna), no estarían dispersas en solución libre; algunas evidencias sugieren que formarían complejos multienzimáticos que aseguran el pasaje del producto de una enzima a la siguiente y con ello un funcionamiento más eficiente del sistema. Sería otro ejemplo de "canalización" del sustrato.

Papel funcional del ciclo del ácido cítrico

La inclusión del ciclo de ácidos tricarboxílicos en este capítulo no significa que sea un mecanismo exclusivamente dedicado a la oxidación final de productos del metabolismo de carbohidratos. En realidad, en él se degradan hasta CO_2 y H_2O todos los restos de dos carbonos del acetil-CoA originados ya sea a partir de glúcidos, de ácidos grasos, de aminoácidos o de cualquier otra sustancia. El ciclo del ácido cítrico es la vía final común para la oxidación de acetatos activos, así como la cadena respiratoria es vía final común de todos los equivalentes de reducción, sin importar su procedencia. En este sentido, se reconoce al ciclo como principal vía catabólica y su funcionamiento depara a las células un importante rédito energético. Pero como también puede funcionar en sentido anabólico, en realidad es un mecanismo *anfibólico*. Algunos de sus intermediarios participan en diversas síntesis, y ello plantea problemas a resolver.

El drenaje de intermediarios, si es exagerado, puede comprometer la operación del sistema, razón por la cual existen vías y reacciones encargadas de reponer los intermediarios utilizados con fines anabólicos. Una de las reacciones de este tipo es la catalizada por *piruvato carboxilasa*, que produce oxaloacetato a partir de piruvato. Participa como coenzima biotina, vitamina del complejo B; la energía es provista por ATP.



Piruvato — Oxaloacetato

Es ésta una importante reacción alimentadora del ciclo del ácido cítrico. La piruvato carboxilasa es activada alostéricamente por acetil-CoA. La acumulación de acetato activo promueve la formación de oxaloacetato y estimula la operación del ciclo. Hay otras vías y reacciones cuyos productos son intermediarios del ciclo. A todas estas vías alimentadoras se las llama *anapleróticas*. Por otro lado, hay reacciones *catapleróticas*, como la catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (pág. 278) que sustrae oxaloacetato del ciclo.

Balance energético del ciclo de Krebs

La oxidación de acetato en el ciclo del ácido cítrico tiene alto rendimiento de energía "capturada" en forma de potencial de transferencia de fosforilo.

En las reacciones de oxidación del ciclo, las coenzimas reducidas ceden sus hidrógenos a la cadena respiratoria, en la cual el flujo de electrones se acopla con el bombeo de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana y se crea un gradiente electroquímico. El retorno de los H^+ a través del canal de la ATP sintasa a favor del gradiente provee la energía para la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i. Cada par de hidrógenos transferidos de NAD genera de 2,5 a 3 moléculas de ATP (a efectos de simplificar los cálculos de rendimiento utilizaremos el factor 3); los que ingresan desde flavoproteínas (FAD) producen 1,5 a 2 ATP (se usará el factor 2). El balance total del ciclo del ácido cítrico por mol de acetato metabolizado se resume en la tabla 14-4.

Tabla 14-4. Balance energético de la oxidación de acetato en el ciclo del ácido cítrico.

Isocitrato → Oxalosuccinato	(NADH)	3 mol ATP
α-Cetoglutarato → Succinil-CoA	(NADH)	3 mol ATP
Succinil-CoA → Succinato		1 mol ATP
Succinato → Fumarato	($FADH_2$)	2 mol ATP
Malato → Oxaloacetato	(NADH)	3 mol ATP
Total por mol de acetato		*12 mol ATP*

Balance energético de la oxidación de la glucosa

Glucólisis. En anaerobiosis cada mol de glucosa genera dos moles de ATP. Cuando hay adecuada provisión de oxígeno, el NAD reducido durante la oxidación de gliceraldehído-3-fosfato transfiere los equivalentes de reducción desde el citosol a la cadena respiratoria mediante alguno de los sistemas lanzadera (pág. 185). Según el mecanismo utilizado, el rendimiento puede ser de tres ATP (para el conmutador malato-aspartato), o de dos (para el de glicerofosfato).

Como una glucosa origina dos triosas-fosfato, por cada glucosa se producen 4 o 6 ATP en esta etapa. Estos, sumados a 2 ATP de la glucólisis, dan 6 u 8 ATP por glucosa.

Descarboxilación del piruvato. Se generan 3 ATP en la cadena respiratoria por transferencia de equivalentes reductores del NAD reducido. Cada glucosa da dos piruvatos; la ganancia de ATP es de 6 moles por mol de glucosa.

Ciclo del ácido cítrico. La producción total por acetato es 12 ATP. Cada glucosa origina dos acetatos; la producción por mol de glucosa es 24 moles de ATP.

La tabla 14-5 resume la producción total de ATP en el catabolismo oxidativo de un mol de glucosa.

Tabla 14-5. Producción energética total de la oxidación de un mol de glucosa.

Glucólisis	6 u 8 moles ATP*
Descarboxilación oxidativa piruvato	6 moles ATP
Ciclo del ácido cítrico	24 moles ATP
Producción total	*36 o 38 moles ATP*

* Según la lanzadera utilizada para transferir los H desde el citosol a la mitocondria.

Como la energía libre de hidrólisis de ATP es 7,3 kcal/mol (30,5 kJ/mol), la energía total captada en forma de ATP por mol de glucosa es de alrededor de 277 kcal (1.159 kJ).

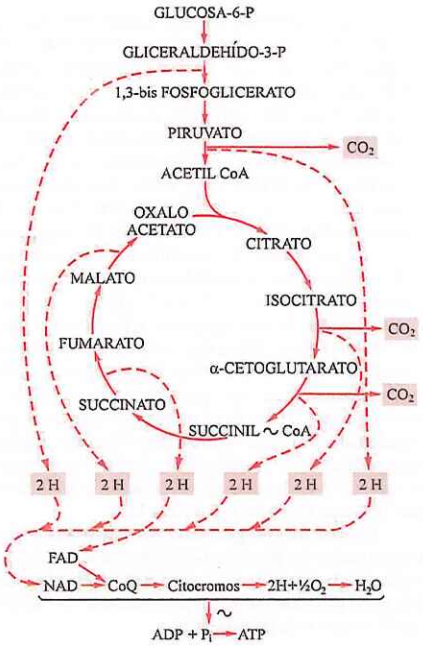


Fig. 14-8. Esquema del catabolismo oxidativo de la glucosa.

La combustión de un mol de glucosa libera 686 kcal (2.870 kJ). El rendimiento (porcentaje de la energía contenida en el combustible aprovechada para realizar trabajo) de la vía oxidativa es aproximadamente 40%. Si se compara con el de máquinas a combustión creadas por el hombre, se comprueba una notable diferencia. Los más eficientes motores no llegan al 30%; pierden más energía como calor o roces inútiles. Esto pone de relieve la eficiencia de los seres vivos en el aprovechamiento del combustible.

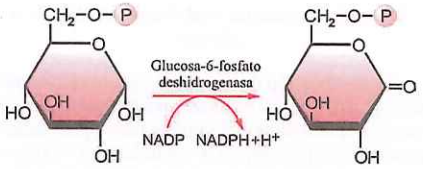
VÍA DE HEXOSA MONOFOSFATO O PENTOSA FOSFATO

En la mayoría de tejidos, 80% o más del catabolismo de la glucosa sigue inicialmente el camino de la glucólisis. El resto ingresa en una vía alternativa llamada de *hexosa monofosfato* o *pentosa fosfato*, que desempeña dos funciones principales: a) generar nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) y b) producir pentosa fosfato para síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos.

La vía de pentosa fosfato comprende una serie de reacciones estrechamente conectadas con la glucólisis, ya que ambos procesos forman intermediarios comunes (fig. 14-9). Puede dividirse en dos fases. En la primera, la glucosa-6-fosfato sufre dos oxidaciones y una descarboxilación que la transforman en una pentosa fosfato, la ribulosa-5-fosfato, y se libera CO_2. Estas tres reacciones constituyen la fase oxidativa, irreversible, en la cual se produce todo el NADPH que la vía genera.

La segunda fase, no oxidativa, comprende una serie de reacciones reversibles en las que se forman aldosas y cetosas de 3, 4, 5, 6 y 7 carbonos. La ribulosa-5-fosfato da dos isómeros, ribosa-5-fosfato y xilulosa-5-fosfato. Estas dos pentosas se combinan y producen una triosa-fosfato y una heptosa-fosfato, las cuales, a su vez, generan hexosa-fosfato y tetrosa-fosfato. Una nueva redistribución forma gliceraldehído-3-fosfato y fructosa-6-fosfato, ambos intermediarios de la glucólisis. Todas las enzimas de esta vía se encuentran en el citosol. Se analizarán sólo las reacciones de la primera fase.

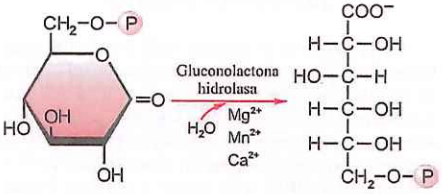
1. **Oxidación de glucosa-6-fosfato.** La deshidrogenación de glucosa-6-fosfato produce-6-fosfogluconolactona y es catalizada por *glucosa-6-fosfato deshidrogenasa*, dependiente de NADP como aceptor de hidrógenos.



Glucosa-6-fosfato — 6-fosfogluconolactona

La enzima es inhibida por NADPH, mecanismo regulatorio que adecua a la demanda la producción de coenzima reducida.

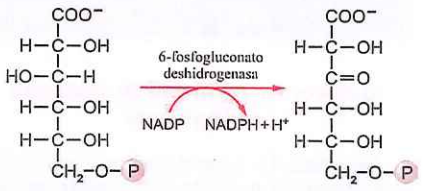
2. **Formación de 6-fosfogluconato.** La 6-fosfogluconolactona es transformada en *6-fosfogluconato por gluconolactona hidrolasa* o *lactonasa*.



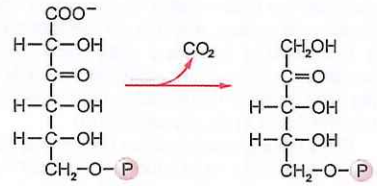
6-fosfogluconolactona — 6-fosfogluconato

3. **Oxidación de fosfogluconato.** El segundo paso oxidativo es catalizado por *6-fosfogluconato deshidrogenasa*, dependiente de NADP.

Los productos de la reacción son ribulosa-5-fosfato y anhídrido carbónico. El proceso tiene lugar en dos pasos, con formación de 3-ceto-6-fosfogluconato como intermediario.



6-fosfogluconato — 3-ceto-6-fosfogluconato



3-ceto-6-fosfogluconato — Ribulosa-5-fosfato

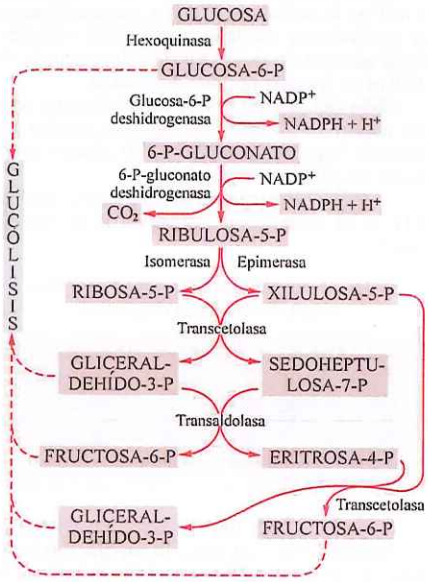


Fig. 14-9. Vía de pentosa fosfato.

Significación funcional de la vía de las pentosas

Aunque la cantidad de glucosa metabolizada por la vía de pentosa fosfato es relativamente pequeña comparada con la que ingresa en la glucólisis, el funcionamiento de esta vía alternativa tiene gran importancia.

Los hidrógenos captados por NADP en las etapas de la primera fase son utilizados en distintos procesos de síntesis: a) ácidos grasos en hígado, tejido adiposo y glándula mamaria lactante; b) colesterol y ácidos biliares en hígado; c) hormonas esteroides en corteza suprarrenal, ovarios y testículos; d) procesos de desintoxicación dependientes de citocromo P_{450} en hígado. En todos los tejidos mencionados, la vía de pentosa fosfato es muy activa. Aunque teóricamente el NADPH puede ceder sus equivalentes de reducción a NAD (reacción catalizada por una transhidrogenasa), que a su vez los transfiere a la cadena respiratoria para generar energía, en condiciones normales los hidrógenos del NADPH son preferentemente derivados hacia vías biosintéticas.

En eritrocitos la vía de pentosa fosfato tiene un papel importante. El NADPH formado cumple una acción protectora contra agentes oxidantes; contribuye a mantener la concentración de glutatión reducido alrededor de los valores normales (5 mM) y a disminuir los niveles de metahemoglobina. En los neutrófilos y otras células fagocíticas se utilizan especies reactivas de oxígeno para destruir las bacterias englobadas. Una de esas especies, el ion superóxido, se forma por reducción de oxígeno catalizada por NADPH oxidasa, que requiere NADPH generado en la vía de pentosa fosfato.

Otra función de la vía de hexosa monofosfato es la producción de ribosa-5-fosfato, utilizada en la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos.

La deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa es la enzimopatía genética más común en humanos. Es frecuente en individuos de raza negra y habitantes de países de la cuenca del Mediterráneo. Es un trastorno hereditario ligado al cromosoma X, que se manifiesta principalmente por fragilidad de glóbulos rojos, con tendencia a la hemólisis cuando los pacientes ingieren ciertos fármacos (primaquina, derivados de sulfamidas, nitrofuranos, aspirina y otras) o alimentos (habas). La falta de NADPH disminuye notablemente la estabilidad de los eritrocitos y es causa de anemia hemolítica.

Otras enfermedades muy poco frecuentes debidas a defectos de enzimas de la vía de pentosa fosfato son las deficiencias de transaldolasa, que producen insuficiencia hepática, de ribosa-5-fosfato isomerasa, que causa leucoencefalopatía y retardo del desarrollo, y de xilitol deshidrogenasa, de carácter benigno y que se relaciona con pentosuria esencial.

GLUCONEOGÉNESIS

La *gluconeogénesis* es el proceso de biosíntesis de glucosa y glucógeno a partir de fuentes no glucídicas. Esto permite obtener glucosa cuando en la dieta no se ofrecen suficientes carbohidratos.

Hay tejidos que obtienen energía indistintamente a partir de glúcidos o lípidos, pero aun así hay siempre un requerimiento basal de glucosa. El sistema nervioso y los eritrocitos sólo utilizan glucosa. En condiciones anaeróbicas, la glucosa es el único combustible proveedor de energía en músculo esquelético.

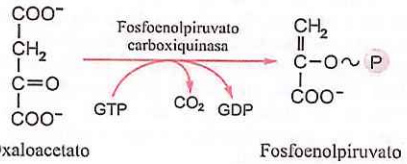
Existen vías para producir glucosa cuando el aporte externo es insuficiente. En humanos, hígado y riñón son los principales órganos gluconeogénicos.

La gluconeogénesis no es simplemente el camino inverso a la glucólisis. En la vía de Embden-Meyerhof las reacciones irreversibles no permiten volver hacia atrás por la misma ruta. En tejidos con capacidad gluconeogénica, esas reacciones se efectúan en sentido inverso gracias a la existencia de desvíos.

1. **Piruvato a fosfoenolpiruvato.** Esta conversión se realiza por un desvío en el cual participan las siguientes reacciones:

a) El piruvato es transformado en oxaloacetato gracias a la *piruvato carboxilasa* que requiere biotina (vitamina del complejo B) y ATP como cofactores. Se introduce CO_2 para formar un carboxilo (págs. 274 y 599). El oxaloacetato es intermediario del ciclo del ácido cítrico, razón por la cual esta reacción constituye un importante dispositivo *anaplerótico*, es decir, alimentador del ciclo. La piruvato carboxilasa es una enzima alostérica, activada por acetil-CoA.

b) El oxaloacetato es convertido en fosfoenolpiruvato por acción de *fosfoenolpiruvato carboxiquinasa*, que cataliza la descarboxilación de oxaloacetato y su transformación en fosfoenolpiruvato, con liberación de CO_2; GTP es el dador de fosfato y energía.



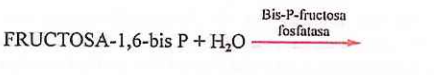
Existen dos isoformas de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa; muchas especies poseen una localizada en mitocondrias, y en todas existe una isozima citosólica. Como el oxaloacetato no atraviesa la membrana interna y sí lo hace el malato, el desvío inicial de la gluconeogénesis se realiza según la siguiente secuencia de etapas: 1) el piruvato se convierte en oxaloacetato (*piruvato carboxilasa*); 2) el oxaloacetato se reduce a malato (*malato deshidrogenasa mitocondrial*); 3) el malato pasa al citoplasma y allí es oxidado a oxaloacetato por la isozima citosólica de *malato deshidrogenasa*; 4) el oxaloacetato es transformado en fosfoenolpiruvato por *fosfoenolpiruvato carboxiquinasa* (fig. 14-10). Las dos primeras reacciones ocurren en la matriz mitocondrial; las dos siguientes, en el citosol.

El oxaloacetato es intermediario de la gluconeogénesis y del ciclo del ácido cítrico. Por esta razón, cualquier metabolito alimentador del ciclo contribuye a generar oxaloacetato, y puede ingresar en la vía gluconeogénica.

El lactato, producto final de la glucólisis en anaerobiosis, es un importante metabolito gluconeogénico previa conversión en piruvato (la reacción piruvato ⇌ lactato, catalizada por *lactato deshidrogenasa*, es fácilmente reversible).

Además de participar en la gluconeogénesis, la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa también abastece otras vías que, a partir de oxaloacetato producen glicerol (gliceroneogénesis), utilizado en la síntesis de triacilglicéridos, y otras moléculas (por ejemplo, serina). A estas vías que sustraen intermediarios del ciclo del ácido cítrico se las denomina *cataleróticas*.

2. **Fructosa-1,6-bisfosfato a fructosa-6-fosfato.** La fructosa-1,6-bisfosfato es hidrolizada a nivel de la unión del fosfato al carbono 1. La reacción es catalizada por *bisfosfofructosa fosfatasa* y libera fosfato inorgánico (P_i).



La bisfosfofructosa fosfatasa es una enzima regulatoria de importancia.

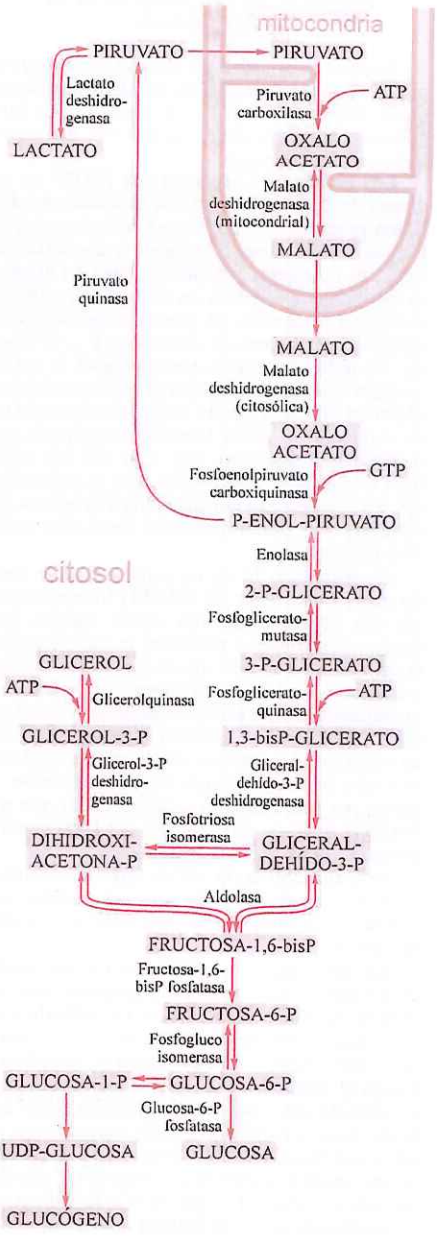


Fig. 14-10. Etapas de la gluconeogénesis.

Glucosa-6-fosfato a glucosa. Catalizada por *glucosa-6-fosfatasa*. La enzima se encuentra en retículo endoplásmico de hígado, riñón e intestino. En estos órganos, la glucosa-6-fosfato formada en el citosol, penetra en la luz del retículo endoplásmico mediante un transportador específico (T1), donde es hidrolizada por la glucosa-6-fosfatasa; los productos, glucosa y P_i, vuelven al citosol a través de sendos transportadores (T2 y T3 respectivamente). La glucosa pasa a la circulación por transportadores GLUT2. La localización de la glucosa-6-fosfatasa en el retículo endoplásmico permite aislarla de la glucólisis y de la vía de pentosa-P. Si la enzima estuviese en el citosol, toda la glucosa-6-P sería hidrolizada y esas vías no podrían funcionar.

El músculo y el tejido adiposo no poseen glucosa-6-fosfatasa y no pueden liberar glucosa a la circulación.

El conjunto de reacciones de la gluconeogénesis se presenta en la figura 14-10. En las condiciones existentes en la célula, el proceso es irreversible.

Se han observado deficiencias de origen genético para las cuatro enzimas de la vía gluconeogénica (piruvato carboxilasa, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, fructosa-1,6-P fosfatasa y glucosa-6-P fosfatasa). En general, estos trastornos se manifiestan por hipoglucemia y acidosis láctica, que pueden ser muy severas y afectar seriamente el sistema nervioso.

Consideraciones generales sobre la gluconeogénesis

El lactato formado durante la glucólisis anaerobia ingresa en la vía gluconeogénica oxidándose a piruvato por acción de la lactato deshidrogenasa. Durante el período de reposo después de un ejercicio intenso, el lactato producido en los músculos difunde a la sangre y es captado por el hígado que lo reconvierte en glucosa y glucógeno.

La participación del oxaloacetato en las dos primeras reacciones de la vía conecta a la gluconeogénesis con el ciclo del ácido cítrico. Como todo intermediario del ciclo se convierte en oxaloacetato a través de las reacciones de esa vía, cualquiera de esos intermediarios, y todo compuesto capaz de transformarse en uno de ellos, puede ser precursor de glucosa. Las cadenas carbonadas de algunos aminoácidos originan α-cetoglutarato, las de otros, succinato, fumarato, oxaloacetato o piruvato (pág. 341) y pueden contribuir a la formación de glucosa.

El acetil-CoA no es glucogénico. A los efectos prácticos, cada resto acetato que ingresa al ciclo del ácido cítrico es completamente oxidado. Por esta razón, los ácidos grasos, degradados en el organismo a acetil-CoA, no se consideran glucogénicos. En cambio, sí lo es el glicerol, otro componente de lípidos. En el hígado, por ejemplo, el glicerol puede ser fosforilado a glicerol-3-fosfato y luego oxidado a dihidroxiacetonafosfato. Esta triosafosfato tiene dos alternativas: seguir el camino de la gluconeogénesis uniéndose a gliceraldehído-3-fosfato para dar fructosa-1,6-bisfosfato, o el de la glucólisis, transformándose en gliceraldehído-3-fosfato y luego 1,3-bisfosfoglicerato; el destino final es determinado por las necesidades de la célula.

Costo energético de la gluconeogénesis

La formación de una molécula de glucosa a partir de dos de piruvato o lactato es un proceso endergónico, que requiere aporte de energía. En el organismo se realiza con disminución de energía libre, gracias al acoplamiento con la hidrólisis de enlaces de alta energía.

Por cada piruvato se consume una molécula de ATP en la primera reacción catalizada por piruvato carboxilasa, una de GTP en la etapa de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y otra de ATP para revertir la reacción de la 3-fosfoglicerato quinasa. En suma, la síntesis de una molécula de glucosa a partir de dos de piruvato debe acoplarse con la conversión de seis moléculas de ATP en ADP.

En el hígado el lactato se transforma en glucosa; la energía es provista por la oxidación de lactato a piruvato. Esta reacción, catalizada por lactato deshidrogenasa, genera NADH + H^+; la transferencia de los hidrógenos a la cadena respiratoria produce 3 ATP. La oxidación completa de un mol de lactato produce un rendimiento de 18 moles de ATP (3 en la reacción de oxidación por lactato deshidrogenasa, 3 en la de descarboxilación oxidativa del piruvato y 12 en la oxidación de acetil-SCoA en el ciclo de Krebs), energía suficiente para la síntesis de tres moles de glucosa.

Gran parte del oxígeno consumido durante el período siguiente a una actividad intensa y breve como, por ejemplo, la realizada por un atleta en una carrera de 100 o 200 m llanos, se emplea en la resíntesis de glucosa y glucógeno a partir de lactato. Se paga la "deuda de oxígeno" contraída durante el ejercicio en anaerobiosis. El hígado entrega luego glucosa a la circulación. En el músculo esta glucosa reconstituye las reservas de glucógeno.

Fig. 14-11. Ciclo de Cori.

Ciclo de Cori

El piruvato formado por degradación de glucógeno o glucosa en músculo es oxidado a CO_2 y H_2O en el propio tejido cuando el suministro de oxígeno es suficiente. Sin embargo, en condiciones de actividad contráctil intensa, la provisión de oxígeno no alcanza a subvenir las necesidades de oxidación; gran parte del piruvato es reducido a lactato, que pasa a la sangre y es captado por el hígado, donde se convierte en glucosa y glucógeno. Cuando la glucemia desciende, el hígado degrada su glucógeno y envía glucosa a la circulación, desde donde la toma el músculo para cubrir sus necesidades o restaurar sus reservas de glucógeno. Se cierra así un ciclo, llamado *ciclo de Cori*, resumido esquemáticamente en la figura 14-11.

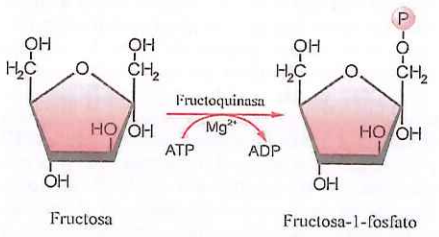
METABOLISMO DE OTRAS HEXOSAS

Fructosa y galactosa son componentes de alimentos de consumo habitual. En condiciones normales, prácticamente toda la fructosa y la galactosa que llegan por la vena porta desde el intestino son captadas por el hígado. Después de una ingesta moderada queda muy poco de estos monosacáridos en la circulación general. Ambas sufren en el hígado transformaciones que generan metabolitos iguales a los producidos a partir de glucosa; por ello, el destino final de las tres hexosas es el mismo.

Metabolismo de fructosa

Para los monosacáridos el proceso de fosforilación es previo a toda otra transformación.

La vía principal de utilización de fructosa se inicia con la fosforilación en el carbono 1. Cataliza la reacción la *fructoquinasa*, enzima muy específica, que se encuentra en el hígado; transfiere fosforilo de ATP.



La fructosa-1-fosfato es escindida entre los carbonos 3 y 4 para dar D-gliceraldehído y dihidroxiacetonafosfato (DHAP). La reacción es catalizada por *aldolasa B* o *fructosa-1-P aldolasa*. Esta enzima es diferente de la aldolasa A, localizada en músculo, que ataca únicamente a la fructosa-1,6-bisfosfato.

El gliceraldehído es fosforilado a gliceraldehído-3-fosfato (G3P) por una *triosaquinasa* dependiente de ATP.

Las tres etapas mencionadas, catalizadas sucesivamente por fructoquinasa, aldolasa B y triosaquinasa, convierten la fructosa en las mismas triosas fosfato que se forman en la glucólisis. Pueden seguir esta vía y finalmente oxidarse a CO_2 y H_2O para proveer energía, o bien ser derivadas hacia la gluconeogénesis y formar glucosa o glucógeno (fig. 14-12).

Una vía alternativa de menor importancia es la fosforilación en el carbono 6 catalizada por *hexoquinasa*. Esta enzima tiene poca afinidad por la fructosa. La fructosa-6-fosfato se incorpora a la vía glucolítica.

La fructosa tiene efecto sinergístico con el metabolismo de la glucosa. Aumenta la afinidad de la glucoquinasa por glucosa y estimula la utilización de esta aldosa en el hígado.

El ingreso de fructosa en la vía glucolítica elude las reacciones limitantes de ésta (formación de G-6-P y F-1,6-bisP). Además la F-1-P es activador alostérico de la piruvato quinasa. Esto explica por qué la formación de lactato es más rápida a partir de fructosa que de glucosa. Una ingesta exagerada de fructosa puede provocar acidosis láctica. Por otro lado, una sobrecarga de fructosa en la dieta satura la vía glucolítica, el gliceraldehído es derivado hacia la formación de triacilglicéridos y puede consumir el ATP de

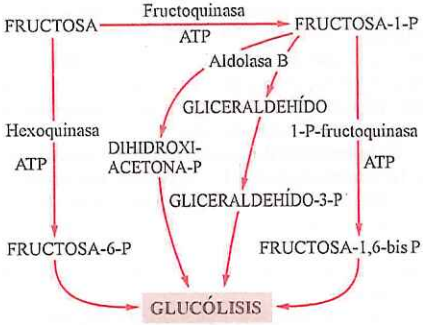


Fig. 14-12. Metabolismo de la fructosa.

los hepatocitos con reducción de otros procesos biosintéticos. Se ha observado aumento de ácido úrico en sangre y orina.

En el semen humano se encuentra fructosa, que los espermatozoides utilizan como fuente de energía. La fructosa es producida en las vesículas seminales a partir de glucosa. El proceso se cumple en dos etapas: en la primera, catalizada por *aldol reductasa* dependiente de NADPH, el carbono 1 de la glucosa es reducido y se forma sorbitol. En la segunda, la *sorbitol deshidrogenasa* ligada a NAD oxida el grupo hidroxilo del carbono 2 del sorbitol y produce fructosa. Las dos enzimas de esta vía también se encuentran en el hígado.

Se conocen varias enfermedades genéticas relacionadas con el metabolismo de la fructosa.

Una de ellas, debida a deficiencia de aldolasa B, recibe el nombre de *intolerancia a la fructosa*. Este trastorno, que se hereda con carácter autosómico recesivo, provoca acumulación de F-1-P y caída de la concentración de ATP y P_i intracelular. Se deprimen la fosforilación oxidativa y todos los procesos metabólicos que requieren energía. Además la F-1-P inhibe a la fosforilasa y la fosfoglucomutasa, y con ello la glucogenólisis. Los pacientes presentan vómitos, falla en el crecimiento y disfunción hepática; hay hipoglucemia aun cuando exista reserva de glucógeno en hígado. Los síntomas se presentan al fin de la lactancia materna exclusiva, cuando el niño empieza a ingerir alimentos con fructosa o sacarosa.

Existe también deficiencia de aldolasa A que produce retardo en el desarrollo corporal y mental.

Se han descrito otros defectos genéticos que alteran la síntesis de fructosa-1,6-bisfosfatasa y causan hipoglucemia, acidosis, cetonuria.

La *fructosuria esencial* es una enfermedad hereditaria debida a falta de fructoquinasa. Los pacientes eliminan fructosa por orina. En general tiene un curso benigno.

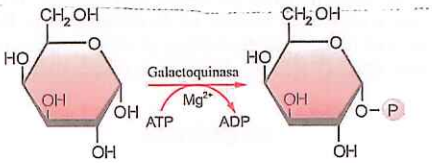
Hay también cuadros de malabsorción de fructosa.

El tratamiento de estos trastornos exige suprimir fructosa y sacarosa en la alimentación.

Metabolismo de galactosa

La galactosa es uno de los productos de hidrólisis de la lactosa (azúcar de leche) en intestino. Su transformación en metabolitos relacionados con glucosa se cumple en el hígado, a través de las siguientes reacciones:

1. **Formación de galactosa-l-fosfato.** El paso obligado de fosforilación inicial es catalizado por *galactoquinasa*, enzima específica que utiliza ATP como donante del grupo fosfato y de la energía necesaria para la reacción. El fosfato esterifica el carbono 1 de la galactosa.



2. **Formación de UDP-galactosa.** La galactosa-l-fosfato reacciona con uridina-difosfato-glucosa (UDPGlc) para formar UDP-galactosa (UDP-Gal) y glucosa-l-fosfato. En esta reacción, catalizada por *galactosa-1-fosfato uridiltransferasa*, la galactosa reemplaza a la glucosa en su unión con UDP.

$$\text{GALACTOSA-1-P} + \text{UDPGlc} \xrightarrow[\text{transferasa}]{\text{Gal-1-P-uridil}} \text{UDP-GALACTOSA} + \text{G-1-P}$$

3. **Formación de UDP-glucosa.** La UDP-galactosa es convertida en UDP-glucosa por acción de una *epimerasa* (*UDP-galactosa-4-epimerasa*) ligada a NAD. La reacción comprende primero una oxidación a cetona del carbono 4 y luego una reducción para reformar el hidroxilo con una configuración inversa a la original.

$$\text{UDP-GALACTOSA} \xrightarrow{\text{Epimerasa}} \text{UDP-GLUCOSA}$$

El UDP-glucosa es intermediario en la síntesis de glucógeno, en reacciones de interconversión de azúcares y en glucosilaciones.

La glándula mamaria lactante sintetiza galactosa para incorporarla en la lactosa de la leche por un proceso que parte de glucosa y sigue un camino inverso al descripto.

Existe una enfermedad hereditaria, autosómica recesiva, llamada *galactosemia*, caracterizada por incapacidad para metabolizar galactosa. La causa más común de galactosemia es la falta de actividad de galactosa-1-fosfato uridiltransferasa. Se produce acumulación de galactosa-1-P en las células y aumento de galactosa en sangre y tejidos que causa daños muy serios en sistema nervioso, hígado y otros órganos. El exceso de galactosa produce también opacificación del cristalino (cataratas). La galactosemia puede deberse también a la falta de epimerasa de UDP-galactosa.

Otro cuadro, más raro, es producido por deficiencia de galactoquinasa.

Es posible prevenir las serias alteraciones que estas enfermedades provocan suprimiendo la leche y derivados lácteos en la alimentación. Por ello es indispensable realizar el diagnóstico precoz, antes de que los daños sean irreversibles.

GLUCEMIA

La sangre venosa de individuos normales, extraída en condiciones de ayuno, contiene glucosa que se mantiene en niveles de 70 a 110 mg por dL o 100 mL (glucemia normal). Los valores son prácticamente los mismos para plasma, suero o sangre total.

La glucemia aumenta en el período posprandial hasta llegar a un máximo media a una hora después de la ingesta. A las dos o tres horas el nivel vuelve a los valores basales de ayuno.

La *prueba de tolerancia a la glucosa* se efectúa con fines diagnósticos, ya que permite detectar posibles fallas en la metabolización de esa hexosa. Se suministra al paciente una sobrecarga de glucosa después de unas 8 horas de ayuno y se determina la evolución de la glucemia en las 3 o 4 horas siguientes (ver pág. 547). En individuos normales se observa aumento de la concentración de glucosa en sangre que llega a su máximo (no más de 170 mg por dL) entre los 30 y 60 minutos. A las 2 horas desciende a sus valores iniciales.

La glucosa de la sangre filtra en los glomérulos renales y, en condiciones normales, es totalmente reabsorbida en los túbulos. La orina normal no contiene glucosa en cantidades detectables. Se reabsorben hasta 350 mg de glucosa por minuto (Tm de glucosa); con glucemias normales, toda la glucosa filtrada regresa a la sangre.

Cuando por cualquier motivo la glucemia sobrepasa el nivel de 160 a 170 mg por dL, se excede la capacidad de reabsorción y aparece glucosa en orina; se produce *glucosuria*. El nivel de glucemia de 160 a 170 mg por dL corresponde al "*umbral renal*" para glucosa.

Homeostasis de la glucemia. La constancia de la glucemia revela la existencia de mecanismos reguladores que aseguran su mantenimiento dentro de los límites indicados. La homeostasis de la glucemia depende del balance entre los procesos que envían glucosa a la sangre y los que la sustraen.

Entre los procesos metabólicos responsables de mantener la constancia de la glucemia se citarán los siguientes:

a. *Regulación de glucogenogénesis y glucogenólisis en el hígado*. Cuando hay exceso de glucosa en sangre, se estimula la glucogenogénesis, es decir, se favorece su almacenamiento en forma de glucógeno, lo cual tiende a sustraer glucosa de la circulación.

Cuando la glucemia desciende por debajo de los niveles normales, se activa la glucogenólisis hepática y se libera glucosa a la circulación general.

b. *Glucogenogénesis y utilización de glucosa en músculo y otros tejidos*. La formación de glucógeno en músculo y la glucólisis en tejidos son procesos que tienden a reducir la glucemia.

c. *Conversión de glucosa en otro tipo de sustancias*. La transformación de la glucosa, principalmente en grasas, contribuye a disminuir los niveles de glucosa en sangre.

d. *Gluconeogénesis*. La formación de glucosa a partir de aminoácidos y otros compuestos provee glucosa a la sangre circulante.

En todos estos procesos interviene un conjunto de hormonas. En el capítulo 25 se estudiará su modo de acción; sólo se mencionará aquí que la insulina, secretada por el páncreas, pone en juego mecanismos tendientes a disminuir el nivel de glucosa en sangre, mientras otras hormonas producidas en hipófisis anterior, corteza y médula suprarrenales, tiroides y el glucagón del páncreas ejercen acciones tendientes a aumentar la glucemia.

Las concentraciones de glucosa en sangre por encima de los valores considerados normales (mayores de 120 mg por dL) configuran un síntoma denominado *hiperglucemia*. Valores menores de 70 mg por dL corresponden a *hipoglucemia*.

Alteraciones de la glucemia. Si la glucemia cae por debajo de los niveles normales, glucorreceptores en el hipotálamo descargan señales que estimulan la secreción de hormonas que tratan de

restablecer esos niveles. A la inversa, la hiperglucemia determina un aumento de la liberación de insulina.

Se produce hipoglucemia en ayunos prolongados, o en el tratamiento con insulina o con fármacos como las sulfonilureas, que promueven la secreción de insulina. También es causada por tumores funcionantes de células β de islotes del páncreas (insulinomas) o ingesta exagerada de alcohol.

La hipoglucemia produce una serie de síntomas. Cuando no es muy acentuada, se manifiesta por debilidad, sudoración, palpitaciones, taquicardia y temblor. Los estados más severos, con glucemias por debajo de 50 mg por dL, se acompañan de síntomas llamados neuroglucémicos, que incluyen cefalea, hipotermia, trastornos en la visión, depresión mental, pérdida de la conciencia y convulsiones.

La hiperglucemia es un síntoma que caracteriza a la diabetes mellitus (pág. 545).

Indice glucémico. La relación entre el aumento de la glucemia producido por la ingestión de una cantidad determinada de un hidrato de carbono y el provocado por la administración oral de una cantidad equivalente de glucosa, da un valor llamado *índice glucémico* (IG). El valor de este índice puede variar entre 100, cuando el carbohidrato produce igual aumento de la glucemia que la glucosa, y 0, cuando no es absorbido y convertido en glucosa en absoluto.

En la práctica se lo mide determinando el área, sobre la línea basal, de la curva obtenida representando en ordenadas los niveles de glucemia medidos cada 30 minutos durante 3 horas desde la ingestión de una comida que contenga 50 g de hidratos de carbono (comida de prueba), y en abscisas el tiempo. Esta área es comparada con la resultante de la ingesta de 50 g de glucosa (comida de referencia). Se divide la superficie de la correspondiente a la comida de prueba por la de referencia y se multiplica por 100.

La galactosa y los disacáridos maltosa, lactosa y trehalosa tienen un IG de 100. La fructosa y la sacarosa dan valores algo menores de 100. El del almidón varía según su estado de digestibilidad en la preparación dietaria consumida. Si puede ser digerido en gran proporción, el IG se aproxima a 100; en cambio, si es del tipo resistente (pág. 238), se acerca a 0. En los polisacáridos no digeribles el valor es cero.

Más recientemente se ha propuesto otro parámetro para medir el efecto de un alimento sobre los niveles de glucemia: el llamado *impacto glucémico*.

Impacto glucémico es la cantidad de glucosa (en gramos) cuya ingesta produce una respuesta de glucemia igual a la inducida por una cantidad dada de alimento.

El índice glucémico refleja el efecto sobre el nivel de glucosa en sangre de los carbohidratos existentes en el alimento, en relación con el producido por una cantidad igual de glucosa; es un valor adimensional. El impacto glucémico se expresa en gramos de glucosa que producen un aumento de la glucemia equivalente a una cantidad dada de alimento (no a la de sus carbohidratos).

NUCLEÓTIDO-AZÚCARES

En las etapas de la glucogenogénesis y del metabolismo de galactosa se ha mencionado la formación de nucleósido difosfato-azúcares (UDP-glucosa y UDP-galactosa).

Leloir y colaboradores fueron los primeros en reconocer la importancia funcional de este tipo de compuestos. Desde ese descubrimiento, en 1949, se han acumulado numerosas evidencias que demuestran el papel de nucleótido-azúcares en procesos metabólicos. Se han aislado muchos compuestos de esta clase; en ellos el azúcar es esterificado en su carbono 1 por el fosfato terminal del nucleótido (fig. 14-13). Excepto para citidinamonofosfato-acetilneuramínico (CMP-NANA), los nucleótido-azúcares conocidos están constituidos por nucleósidos-difosfato.

Los nucleótido-azúcares participan principalmente en interconversiones de monosacáridos y transferencia de restos glicosídicos. Estas sustancias son formas "activadas" de monosacáridos; el resto glucídico adquiere en ellas gran reactividad química, que lo capacita para intervenir en combinaciones.

Como ejemplos del primer tipo de reacciones se mencionarán: a) el residuo galactosil de UDP-galactosa se epimeriza para dar UDP-glucosa; b) el resto glucosilo de UDP-glucosa se oxida en

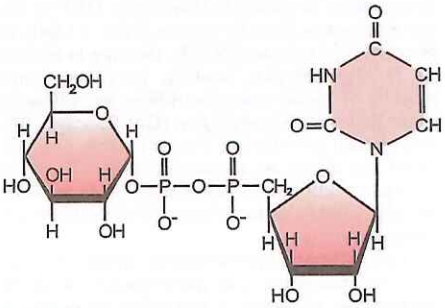


Fig. 14-13. Uridinadifosfato glucosa (nucleótido azúcar).

el carbono 6 para formar UDP-glucuronato, c) GDP-manosa se convierte en GDP-fucosa, etc.

Con respecto a la participación de nucleótido-azúcares en transferencia de monosacáridos, debe señalarse que las unidades utilizadas en la construcción de poli- y oligosacáridos de todos los tipos existentes en el organismo son activadas de esta manera para su incorporación en el polímero.

La forma activa de glucuronato utilizada para conjugar hormonas esteroideas, bilirrubina y muchos medicamentos y sustancias extrañas es UDP-glucuronato. Estas reacciones son catalizadas por *glucuronil transferasa*.

La glándula mamaria sintetiza lactosa por unión a glucosa de un resto galactosil de UDP-galactosa.

BIOSÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS DE GLICOPROTEÍNAS

Los oligosacáridos componentes de moléculas de glicoproteínas se unen a la apoproteína por uno de dos tipos de enlace: a) *Unión O-glicosídica*. En la mayoría de los casos se liga el carbono 1 de galactosamina N-acetilada con el O de la función hidroxilo de restos serina (Ser) o treonina (Thr) de la cadena polipeptídica. b) *Unión N-glicosídica*. El C1 de glucosamina N-acetilada se fija al N-amídico de un residuo asparragina (Asn) en la proteína. La biosíntesis de cada tipo de oligosacárido sigue caminos diferentes.

En todas las vías de síntesis participan enzimas llamadas *glicosil transferasas* que catalizan la transferencia de restos azúcar desde un donante a un sustrato aceptor. El donante generalmente es nucleósido-difosfato-azúcar. Por ejemplo, UDP actúa como portador de glucosa (Glc), galactosa (Gal), glucosamina N-acetilada (GlcNAc) y galactosamina N-acetilada (GalNAc); GDP es dador de manosa (Man) y fucosa (Fuc), y CMP, de N-acetil neuraminato (NAN). Durante la síntesis de N-oligosacáridos también interviene como donante de restos monosacarídicos un poliprenol fosforilado, el *dolicol fosfato* (Dol-P) (pág. 109). Las glicosil transferasas tienen notable especificidad por el azúcar, el sustrato sobre el cual lo insertan y el tipo de enlace. Cada una de las uniones glicosídicas en un oligosacárido requiere una enzima distinta.

Las cadenas oligosacarídicas unidas a N sufren procesamiento con participación de glicosidasas que catalizan la remoción de restos de azúcares.

La mayoría de glicosil transferasas y glicosidasas se encuentra en membranas de retículo endoplásmico y aparato de Golgi.

Biosíntesis de oligosacáridos unidos a serina o treonina (O-oligosacáridos)

Ejemplos de la estructura de estas cadenas se presentan en la figura 4-20. La biosíntesis de O-oligosacáridos se realiza por adición ordenada de monosacáridos; la secuencia de unidades constituyentes de la cadena es determinada por la especificidad de las glicosil transferasas participantes.

El primer residuo, generalmente galactosamina N-acetilada, es fijado al hidroxilo de serina o treonina. A continuación se agregan sucesivamente las otras unidades, por ejemplo galactosa, cedida por UDP-Gal; fucosa, por GDP-Fuc, etc. Los enlaces son de tipo α o β-glicosídico y unen el C1 del monosacárido al C 2, 3, 4 o 6 de la unidad anterior. Cuando se inserta ácido N-acetil neuramínico (NANA) cesa la incorporación de azúcares. NANA parece ser la señal de fin de la glicosilación.

En la mayoría de células, la glicosilación con enlace O se realiza en el complejo de Golgi.

Biosíntesis de oligosacáridos unidos a asparragina (N-oligosacáridos)

El proceso es más complejo que el de O-glicosilación. Hay una primera serie de reacciones en las cuales se ensambla una cadena precursora sobre un soporte lipídico, *dolicol fosfato*, "anclado" en membranas del retículo endoplásmico. Una vez formado el precursor, es transferido desde dolicol-P a un residuo asparragina de la proteína. A partir de esta etapa, el precursor sufre una serie de cambios, que comprenden remoción de algunos residuos y adición de otros; al final, la cadena adquiere las características distintivas de los diferentes tipos de N-oligosacáridos (ricos en manosa, complejos o híbridos).

1. *Síntesis de precursor*. La molécula soporte es dolicol fosfato. La síntesis se inicia con adición de GlcNAc-P a dolicol fosfato. Se forma pirofosfato (GlcNAc-P-P-Dol). Luego se agregan otra unidad GlcNAc y cinco manosas, cedidas por UDP-GlcNAc y GDPMan, respectivamente. En etapas sucesivas se añaden cuatro residuos manosa y tres glucosas, donados por dolicol-P-Man y dolicol-P-Glc. Se ensambla un oligosacárido ramificado cuya composición es $(Glc)_3$

-$(Man)_9$-$(GlcNAc)_2$-, que permanece unido a dolicol-pirofosfato (ver tipos de enlaces en fig. 4-21). Esta cadena es entonces transferida de dolicol-P-P- a un residuo asparragina de la proteína. La reacción es catalizada por *oligosacaridil transferasa*. Para ser receptor del oligosacárido, el resto asparragina debe estar formando parte de una secuencia Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido.

El dolicol fosfato queda libre y es nuevamente utilizado (*ciclo de Dol-P*, fig. 14-14).

2. *Procesamiento del precursor*. La cadena $(Glc)_3$-$(Man)_9$-$(GlcNAc)_2$- unida a N amídico de un resto asparragina es sometida a distintas modificaciones. Los tres restos glucosa son eliminados por *glucosidasas* específicas, una α-*manosidasa* separa un resto manosa y queda el oligosacárido $(Man)_8$-$(GlcNAc)_2$-. Hasta este punto todas las etapas ocurren en el retículo endoplásmico; desde aquí el precursor es transferido en vesículas hacia el complejo de Golgi, donde se dan los "retoques" finales a la cadena.

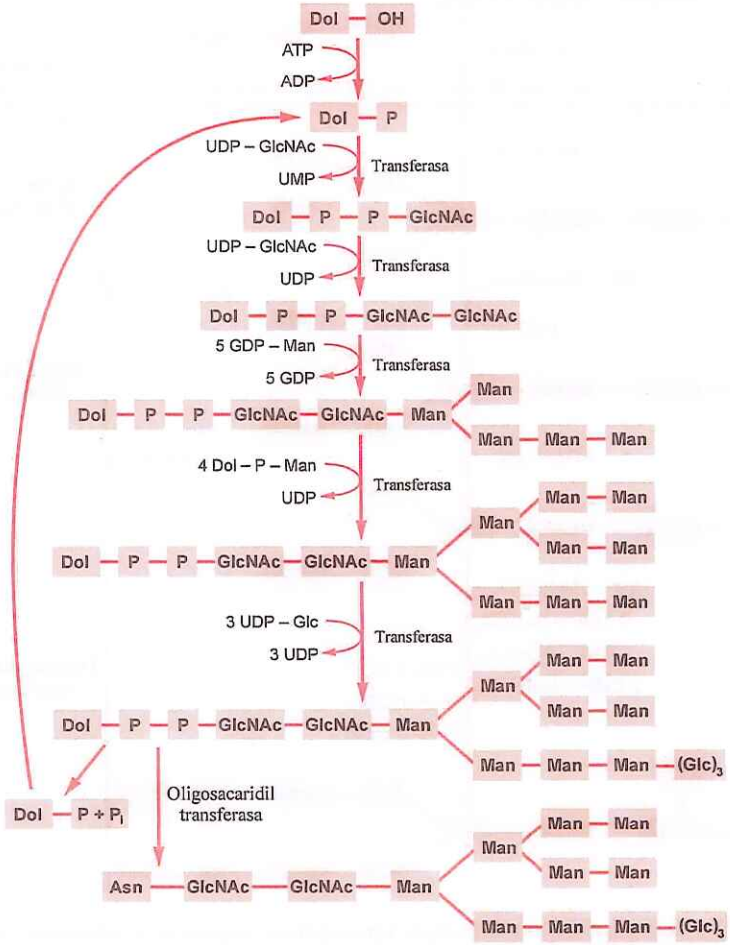


Fig. 14-14. Etapas de la biosíntesis del precursor de oligosacáridos unidos al N amídico de restos asparragina en glicoproteínas. Dol-OH: dolicol, GlcNac: N-acetil glucosalina, Man: manosa, Glc: glucosa, Asn: asparragina, UDP: uridina difosfato, UMP: uridina monofosfato, GDP: guanosina difosfato.

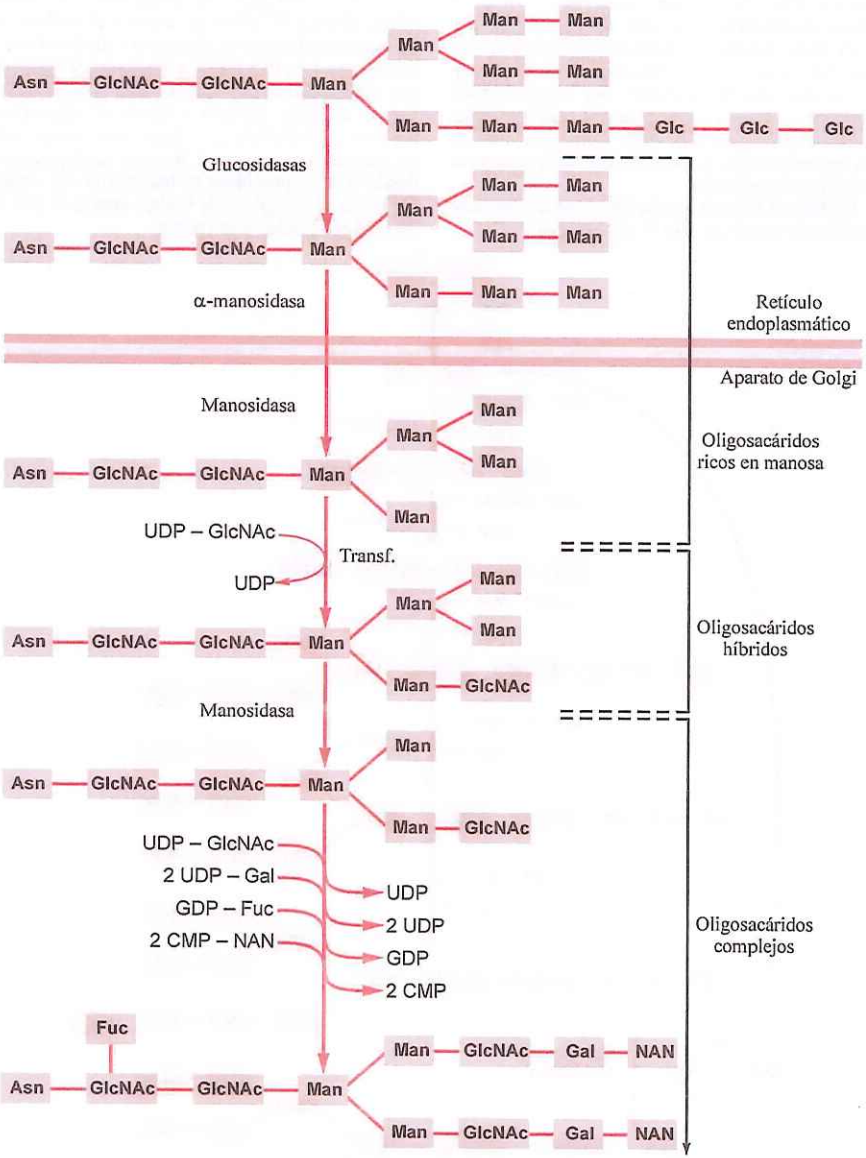


Fig. 14-15. Representación simplificada de las etapas del procesamiento del precursor de polisacáridos unidos a asparragina. Ver referencia de abreviaturas en la leyenda de figura 14-14; además, Gal: galactosa, CMP: citidina monofosfato, NAN: N-acetil- neuraminato.

Los oligosacáridos *ricos en manosa*, después de la pérdida de los tres restos glucosa del precursor sufren remoción de un número variable de manosas (hasta 4); el producto terminal puede tener de 5 a 9 residuos manosa (fig. 14-14). La hidrólisis de enlaces de manosas es catalizada por *manosidasa*.

Los oligosacáridos *complejos* e *híbridos* resultan de diferentes procesamientos del precursor intermedio. Para cadenas complejas, la acción de manosidasas elimina restos manosa hasta dejar la estructura básica $(Man)_3$-$(GlcNAc)_2$–, común a todos los tipos de oligosacáridos unidos a N (fig. 4-21). Sobre ella se agregan distintos azúcares; las ramas se elongan y a veces se crean nuevas ramificaciones. La inserción de cada unidad es catalizada por una glicosil transferasa específica y los donantes de monosacáridos son los nucleótido-azúcares respectivos. Este mecanismo genera una gran variedad de oligosacáridos; la cadena sintetizada es característica para cada glicoproteína. La figura 14-15 presenta etapas del procesamiento descripto.

Degradación de proteoglicanos y glicoproteínas

Llegados al fin de su vida útil, proteoglicanos y glicoproteínas son incorporados a las células por endocitosis. Las vesículas endocíticas se fusionan con lisosomas, dentro de los cuales se encuentran diversas hidrolasas que proceden a la degradación del material importado. La proteína es reducida a aminoácidos por catepsinas y la porción carbohidrato es sometida a la acción de endo- y exoglicosidasas. Las endoglicosidasas (ej.: hialuronidasa) dividen las cadenas en oligosacáridos y posteriormente exoglicosidasas específicas para cada tipo de enlace eliminan sucesivamente, de a uno por vez a partir del extremo no reductor, los residuos terminales.

Existe un grupo de enfermedades, las *mucopolisacaridosis*, debidas a defectos genéticos que afectan la síntesis de glicosidasas. La imposibilidad de degradar heteropolisacáridos determina su acumulación en tejidos. Estas alteraciones se incluyen en el conjunto de *enfermedades lisosomales*. Algunas de ellas se resumen en la tabla 14-6.

Tabla 14-6. Mucopolisacaridosis.

Tipo	*Enfermedad*	*Enzima deficiente*	*Síntomas*
IH	Hurler	α-L-Iduronidasa	Severo retardo mental, deformidades óseas, cambios somáticos severos. Opacidad córnea. Dermatansulfato y heparansulfato en tejido y orina.
IS	Scheie	α-L-Iduronidasa	Alteraciones esqueléticas leves. Sin retardo mental. Opacidad córnea. Dermatansulfato en orina.
II	Hunter (dos tipos)	Iduronato sulfatasa	Moderado retardo mental, severas deformaciones esqueléticas, sodera, cambios somáticos. Dermatansulfato y heparansulfato en tejido y orina.
III	Sanfilippo (cuatro tipos A a D)	*A*. Heparan N-sulfatasa *B*. N-acetilglucosaminidasa *C*. N-acetiltransferasa *D*. N-acetilglucosamina-6-sulfatasa	Glucógeno anormal con cadenas largas muy poco ramificadas. Muerte temprana por insuficiencia cardíaca o hepática.
IV	Morquio (dos tipos)	*A*. Galactosa-6-sulfatasa *B*. β-galactosidasa	Severas deformaciones esqueléticas, sin retardo mental. Keratansulfato en orina.
VI	Maroteaux-Lamy	N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (arilsulfatasa B)	Severas deformaciones esqueléticas, opacidad corneal, sin retardo mental. Dermatansulfato en orina.
VII	Sly	β-glucuronidasa	Retardo mental. Dermatansulfato y heparansulfato en orina.

RESUMEN

Ingreso de glucosa en las células. La glucosa ingresa en las células de mucosa intestinal gracias al sistema de cotransporte Na^+-glucosa (SGLT), dependiente de Na^+, K^+-ATPasa. Los túbulos renales también absorben glucosa del filtrado por el mismo sistema de transporte activo secundario. Todo otro tránsito de glucosa a través de membranas se hace por difusión facilitada mediada por la familia de proteínas GLUT, cuyos miembros tienen distribución tisular selectiva y propiedades funcionales diferentes.

Fosforilación de glucosa. Es el paso inicial de todas las vías de utilización de glucosa. Esta es esterificada por fosfato en el C 6 y forma glucosa-6-fosfato (G-6-P). Catalizada por *hexoquinasa*, que presenta cuatro isozimas. Hexoquinasas I a III, cuya K_m para glucosa varía entre 0,01 y 0,1 mM, no modifican significativamente su actividad con los cambios habituales de glucemia, siempre muy por encima de esos valores (concentración normal en humores y células, 5 mM). Esto asegura continua utilización de glucosa por las células. Hexoquinasas I a III son inhibidas por producto (G-6-P). La isozima IV o *glucoquinasa* se encuentra en hígado y células β de islotes de Langerhans en páncreas; su K_m para glucosa es 10 mM; la actividad se ajusta a la cantidad de glucosa disponible y permite captación de glucosa cuando los niveles en sangre aumentan (por ej., después de las comidas). No es inhibida por G-6-P. Las hexoquinasas requieren ATP y Mg^{2+}. En condiciones fisiológicas, la reacción es irreversible.

Glucogenogénesis. Se realiza en muchos tejidos; los más importantes por la cantidad sintetizada y almacenada son hígado y músculo. Se cumple a través de varias etapas: 1. *Fosforilación de glucosa*: la hexoquinasa cataliza la conversión de glucosa en G-6-P. 2. *Formación de glucosa-1-fosfato*: fosfoglucomutasa convierte G-6-P en G-1-P. Requiere Mg^{2+} y el cofactor G-1,6-bisP. Reversible. 3. *Formación de uridina difosfato glucosa*: UDP-glucosa pirofosforilasa cataliza la formación de UDP-glucosa a partir de UTP y G-1-P. La glucosa se ha "activado". Irreversible. 4. *Adición de glucosa al polímero*: Glucógeno sintasa o glucosil transferasa requiere glucógeno preexistente. Sobre él fija restos glucosa por unión α1⟶4. Prácticamente irreversible. Forma cadenas lineales. 5. *Formación de ramificaciones*: amilo-α(1,4)⟶α(1,6)-glucantransferasa o enzima ramificante. Transfiere segmentos de unas 6 glucosas en cadena lineal y los inserta en otra cadena vecina por unión α1⟶6. Cuando no existen restos previos de glucógeno, la síntesis requiere una proteína iniciadora, *glucogenina*, que actúa autocatalíticamente y forma una cadena lineal de 6 a 7 glucosas en unión α1⟶4, ancladas a un resto tirosina de la proteína. Sobre esta cadena inicial siguen actuando glucógeno sintasa y enzima ramificante.

Glucogenólisis. No es simple inversión de la glucogenogénesis. 1. *Fosforólisis de glucógeno*: la fosforilasa cataliza la ruptura de uniones glucosídicas α1⟶4 por introducción de fosfato en C 1 de los restos glucosa. Libera G-1-P de la cadena hasta 4 unidades antes de una unión α-1⟶6. Entonces interviene la oligo-α(1,4)⟶α(1,4)-glucantransferasa, que desprende el trisacárido terminal y lo transfiere al extremo de una rama vecina por una unión α1⟶4. 2. *Hidrólisis de uniones α1⟶6*: la oligo-α1⟶6-glucosidasa o enzima desramificante deja en libertad glucosa. 3. *Formación de G-6-P*: la fosfoglucomutasa convierte G-1-P en G-6-P. 4. *Formación de glucosa*: la glucosa-6-fosfatasa cataliza la hidrólisis de G-6-P en glucosa y fosfato. Irreversible. La enzima se encuentra en retículo endoplásmico de hígado, riñón e intestino; no existe en músculo.

Glucólisis. Es la principal vía de catabolismo de glucosa, también llamada vía de Embden-Meyerhof. Todas las enzimas de esta vía se encuentran en citosol. 1. *Formación de G-6-P*: hexoquinasa. Irreversible. Cuando se parte de glucógeno, se requiere fosforilasa y fosfoglucomutasa para llegar a G-6-P. 2. *Formación de fructosa-6-fosfato*: la fosfoglucoisomerasa convierte G-6-P en F-6-P; requiere Mg^{2+} o Mn^{2+}. Reversible. 3. *Fosforilación de F-6-P*: la fosfofructoquinasa cataliza la adición de fosfato a F-6-P para dar F-1,6-bisP. Requiere ATP y Mg^{2+}. Irreversible. Importante etapa regulatoria. 4. *Formación de triosas-fosfato*: la aldolasa cataliza la ruptura de F-1,6-bisP en gliceraldehído-3-P (G3P) y dihidroxiacetona fosfato (DHAP). Reversible. 5. *Interconversión de triosas-fosfato*: triosa-fosfato isomerasa. Reversible. DHAP se convierte en G3P para continuar la vía. 6. *Oxidación y fosforilación de gliceraldehído-3-P*: gliceraldehído-3-P deshidrogenasa, utiliza NAD y requiere P_i. Se forma 1,3-bisP-glicerato, compuesto rico en energía. 7. *Formación de 3-fosfoglicerato*: fosfogliceratoquinasa. El fosforilo es transferido a ADP para formar ATP. Es una fosforilación a nivel de sustrato. Las reacciones 6 y 7 juntas resultan reversibles. 8. *Formación de 2-fosfoglicerato*: la fosfoglicerato mutasa convierte 3-fosfoglicerato en 2-fosfoglicerato. Requiere Mg^{2+}; reversible. 9. *Formación de fosfoenolpiruvato*: la enolasa cataliza la deshidratación y conversión de 2-fosfoglicerato en fosfoenolpiruvato, compuesto rico en energía. Requiere Mg^{2+} o Mn^{2+} ; reversible. 10. *Formación de piruvato*: la piruvato quinasa cataliza la transferencia de fosfato de fosfoenolpiruvato a ADP. Se forma ATP. Requiere Mg^{2+} o Mn^{2+} y K^+. Irreversible. Es la segunda fosforilación a nivel de sustrato de la vía. El enolpiruvato se transforma espontáneamente en piruvato. 11. *Formación de lactato*: en condiciones de anaerobiosis, el piruvato es reducido a lactato. Catalizada por lactato deshidrogenasa. Permite reoxidación de NADH y mantenimiento de la glucólisis. Reversible.

El resultado total de la glucólisis es la conversión de una molécula de glucosa en dos de lactato más 2 H^+. El balance energético final es ganancia neta de 2 moles de ATP por mol de glucosa utilizado.

Descarboxilación oxidativa de piruvato. Se produce en mitocondrias, catalizada por el sistema multienzimático piruvato deshidrogenasa, constituido por tres enzimas: *piruvato descarboxilasa*, *dihidrolipoil transacetilasa* y *dihidrolipoil deshidrogenasa*. Requiere cinco coenzimas: *pirofosfato de tiamina*, *ácido lipoico*, *coenzima A*, *FAD* y *NAD*. Como productos de la reacción se forman CO_2, acetil-CoA o "acetato activo" y NADH + H^+.

Ciclo del ácido cítrico. También llamado ciclo de ácidos tricarboxílicos o de Krebs. Es vía de oxidación de restos acetilos producidos por degradación de distintos compuestos, ya sean glucosa, ácidos grasos, cadenas carbonadas de aminoácidos u otros compuestos. Las etapas del ciclo son: 1. *Formación de ácido cítrico*: la citrato sintasa cataliza la

condensación del resto de 2 C de acetil-CoA con oxaloacetato para formar citrato. Irreversible. Etapa regulatoria. 2. *Formación de isocitrato*: la aconitasa cataliza la conversión de citrato, primero en cisaconitato y luego en isocitrato. 3 y 4. *Oxidación y descarboxilación de isocitrato*: ambas catalizadas por isocitrato deshidrogenasa. El isocitrato es oxidado a oxalosuccinato y éste es descarboxilado a α-cetoglutarato. Utiliza NAD; se libera CO_2. Etapa regulatoria. 5. *Descarboxilación de α-cetoglutarato*: catalizada por un sistema multienzimático, la α-cetoglutarato deshidrogenasa, similar al complejo piruvato deshidrogenasa. Formado por tres enzimas, utiliza las mismas cinco coenzimas. Se libera CO_2; irreversible. 6. *Formación de succinato*: el succinil-CoA formado en la etapa anterior es convertido en succinato y CoA libre por la succinato tioquinasa. Requiere GDP y P_i; se forma GTP, que puede ceder un fosforilo a ADP para dar ATP. Es la única etapa del ciclo en la cual hay fosforilación a nivel de sustrato. 7. *Oxidación de succinato*: la succinato deshidrogenasa convierte succinato en fumarato. Utiliza FAD. Está firmemente unida a membrana interna de mitocondrias. Etapa regulatoria. 8. *Hidratación de fumarato*: la fumarato hidratasa o fumarasa cataliza la adición de agua a fumarato para formar malato. 9. *Oxidación de malato*: la malato deshidrogenasa utiliza NAD; oxida malato a oxaloacetato, con lo cual se completa el ciclo.

Durante una vuelta completa del ciclo se liberan dos moléculas de CO_2 y se transfieren cuatro pares de H (3 a NAD y uno a FAD). El ciclo del ácido cítrico es vía final de oxidación de restos acetatos de cualquier procedencia. También cumple un papel anabólico, proveyendo intermediarios para diversas síntesis. Las vías alimentadoras el ciclo se llaman *anapleróticas*. El funcionamiento del ciclo produce 12 moles de ATP por mol de acetato oxidado. La oxidación total de glucosa, teniendo en cuenta la glucólisis, descarboxilación de piruvato y ciclo del ácido cítrico, rinde 36 o 38 moles de ATP por mol de glucosa, lo cual significa un total de 277 kcal/mol (1.159 kJ/mol), un rendimiento del 40% de la energía contenida en un mol de glucosa (686 kcal 2870 kJ).

Vía de pentosa fosfato. Las tres primeras reacciones: 1. *Oxidación de G-6-P*: la glucosa-6-P deshidrogenasa, ligada a NADP, cataliza la formación de 6-fosfogluconolactona. 2. Formación de 6-fosfogluconato: la 6-P-gluconolactona hidrolasa convierte 6-P-gluconolactona en 6-fosfogluconato. 3. *Oxidación de 6-fosfogluconato*: la 6-fosfogluconato deshidrogenasa utiliza NADP. Forma ribulosa-5-P y CO_2. En etapas siguientes se forman ribosa-5-P y otros metabolitos, entre ellos intermediarios de la glucólisis. Esta vía produce NADPH, que cede H para distintos procesos de síntesis y ribosa-5-P, utilizada en síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos.

Gluconeogénesis. La inversión de la glucólisis debe utilizar enzimas distintas en las etapas irreversibles de ésta. 1. *Piruvato a fosfoenolpiruvato*: el camino de vuelta se realiza por un desvío que comprende dos etapas: a) el piruvato es transformado en oxaloacetato por piruvato carboxilasa, enzima alostérica que requiere biotina y ATP; b) el oxaloacetato es convertido en fosfoenolpiruvato por la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. Requiere GTP. 2. *Fructosa-1,6-bisfosfato a fructosa-6-fosfato*: la bisfosfofructosa fosfatasa cataliza la hidrólisis. Enzima regulatoria. 3. *Glucosa-6-P a glucosa*: la glucosa-6-fosfatasa deja en libertad glucosa. Se encuentra en hígado, riñón e intestino; no en músculo. De *glucosa-1-fosfato a glucógeno*: se requiere UDP glucosa pirofosforilasa, glucógeno sintasa y enzima ramificante.

El lactato ingresa en la gluconeogénesis previa oxidación a piruvato. Cualquier sustancia capaz de transformarse en uno de los intermediarios del ciclo del ácido cítrico es potencialmente glucogénico. Acetil-CoA no es glucogénico. La síntesis de un mol de glucosa a partir de dos de piruvato exige el gasto de 6 moles de ATP.

Metabolismo de fructosa. La hexoquinasa cataliza la fosforilación de fructosa en C6 para dar F-6-P, ésta es una vía menor, la vía principal se inicia con fosforilación en C 1, catalizada por fructoquinasa; requiere ATP. F-1-P es escindida en gliceraldehído y dihidroxiacetonafosfato por acción de aldolasa B. El gliceraldehído es fosforilado a gliceraldehído-3-P, que sigue la vía glucolítica. F-1-P también puede fosforilarse en C6 para dar F-1,6-bisP, otro intermediario de la glucólisis.

Metabolismo de galactosa. 1. *Formación de galactosa-1-fosfato*: galactoquinasa, requiere ATP. 2. *Formación de UDP-galactosa*: galactosa-1-fosfato uridil transferasa. 3. *Formación de UDP-glucosa*: epimerasa convierte UDP-galactosa en UDP-glucosa.

Glucemia. El nivel normal de glucosa en sangre se mantiene entre 70 y 110 mg por dL. Después de las comidas se produce un aumento transitorio. El mantenimiento de esos valores exige un complejo mecanismo de regulación.

Nucleótido-azúcares. Forma "activada" de monosacáridos. Participan principalmente en la interconversión de monosacáridos y transferencia de restos glicosídicos.

Síntesis de oligosacáridos de glicoproteínas. Cadenas ligadas por enlace O-glicosídico se sintetizan agregando secuencialmente unidades monosacarídicas directamente al OH- de restos serina o treonina de la proteína. El primer azúcar comúnmente es GalNAc. En cada una de las adiciones participan glicosil transferasas específicas. Donantes de monosacáridos son nucleótido-azúcares. Las cadenas fijadas mediante enlaces N-glicosídicos se sintetizan por un proceso algo más complejo. Se ensambla un precursor sobre un soporte lipídico, *dolicol fosfato*. La primera unidad generalmente es GlcNAc-P; se agregan otras hasta formar una estructura ramificada $[(Glc)_3\text{-}(Man)_9\text{-}(GlcNAc)_2\text{-}]$. Donantes de las primeras siete unidades son nucleótido-azúcares y de las siete últimas, dolicol-P-azúcar. La cadena precursora es transferida en bloque a la proteína y fijada al N amídico de un resto asparragina. Se produce remoción de los 3 restos glucosa y de algunas manosas, originando oligosacáridos ricos en manosas. La síntesis de oligosacáridos complejos e híbridos requiere eliminación de más manosas y posterior adición de diferentes unidades de azúcares. El proceso de biosíntesis se cumple en retículo endoplásmico y complejo de Golgi.

BIBLIOGRAFÍA

Alonso M.D., Lomako J., Lomako W.M., Whelan W.J. (1995). A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB Journal*, 9: 1126-1137.

Bollen M., Keppens S., Stalmans W. (1998). Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochemical Journal*, 336: 19-31.

Munro J.A., Shaw M. (2008). Glycemic impact, glycemic glucose equivalents, glycemic index, and glycemic load: definitions, distinctions, and implications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87 (Suppl.): 237S-243S.

Rustin P., Bourgeron T., Parfait B., Chretien D., Munnich A., Rötig A. (1997). Inborn errors of the Krebs cycle: a group of unusual mitochondrial diseases in human. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 1361: 185-197.

Mann G.E., Yadilevich D.L., Sobrevia L. (2001). Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiological Reviews*, 83: 183-252.

Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Velle D. (Eds.). (2001). *Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8va. Ed., McGraw Hill, Nueva York.

Van den Berghe G. (1994). Inborn errors of fructose metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 14:41-58.

Van den Berghe G. (1996). Disorders of gluconeogenesis. *Journal of Inherited Metabolic Diseases*, 19: 470-477.

Wamelink M.M.C., Struys E.A., Jakobs C. (2008). The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: A review. *Journal of Inherited Metabolic Diseases*, 31: 703-717.

CAPÍTULO 15

Metabolismo de lípidos

Triacilglicéridos. Los lípidos predominantes en la dieta humana son triacilgliceroles (TAG) o grasas neutras, cuyo catabolismo en los tejidos genera abundante energía.

Los productos de digestión de grasas en intestino, principalmente ácidos grasos y monoacilgliceroles, ingresan en los enterocitos donde son utilizados para sintetizar TAG. Estas grasas neoformadas son incluidas, junto con pequeña proporción de colesterol, en partículas lipoproteicas (quilomicrones) encargadas del transporte en el plasma de lípidos procedentes de los alimentos (lípidos exógenos). En el hígado hay también intensa actividad de síntesis de TAG, los cuales son enviados a la circulación en otras partículas lipoproteicas, las lipoproteínas de muy baja densidad, responsables del transporte de lípidos endógenos.

En los capilares sanguíneos, las grasas de los quilomicrones y las de lipoproteínas de muy baja densidad sufren hidrólisis total y forman ácidos grasos y glicerol, que pasan a las células. El glicerol es metabolizado en los tejidos que tienen capacidad para fosforilarlo. Los ácidos grasos son oxidados en la gran mayoría de tejidos por un proceso que genera restos de dos carbonos unidos a coenzima A (acetil-CoA).

El acetil-CoA o "acetato activo" es una importante "encrucijada metabólica" a la cual convergen diversas vías. El compuesto puede seguir varios caminos, entre ellos el ciclo del ácido cítrico, la síntesis de ácidos grasos, y de colesterol. La producción de ácidos grasos a partir de segmentos de dos carbonos es particularmente activa en hígado, tejido adiposo, glándula mamaria y cerebro, que también tienen capacidad para sintetizar triacilgliceroles.

Los TAG constituyen la mayor parte de los lípidos almacenados en depósitos grasos del organismo y representan el principal material de reserva energética. En este sentido, las grasas poseen ventajas sobre los hidratos de carbono. Su valor calórico es más del doble (9 kcal o 37,6 kJ por g para grasas, 4 kcal o 16,7 kJ por g para carbohidratos y proteínas). Por otra parte, el contenido de agua de los depósitos grasos es muy reducido comparado con el de glucógeno. Las grasas constituyen la forma de almacenamiento de energía química más concentrada posible.

Durante mucho tiempo los lípidos de depósito fueron considerados un material inerte, al cual sólo se recurre cuando el ingreso de alimentos no cubre las necesidades calóricas. Esto no es así; hoy se sabe que las grasas corporales están sometidas a permanente degradación y resíntesis.

La figura 15-1 presenta un resumen del metabolismo de triacilgliceroles.

Si bien desde el punto de vista energético es teóricamente posible sustituir grasas de la dieta por hidratos de carbono, la inclusión de lípidos en la alimentación es necesaria para aportar ácidos grasos poliinsaturados indispensables o esenciales y vitaminas liposolubles, sustancias que el organismo no puede sintetizar.

Los ácidos grasos poliinsaturados de 20 carbonos son utilizados para la síntesis de eicosanoides, compuestos que intervienen en la regulación de muchos procesos celulares.

Glicerofosfolípidos y esfingolípidos. En este capítulo se considerarán además la síntesis y la de-

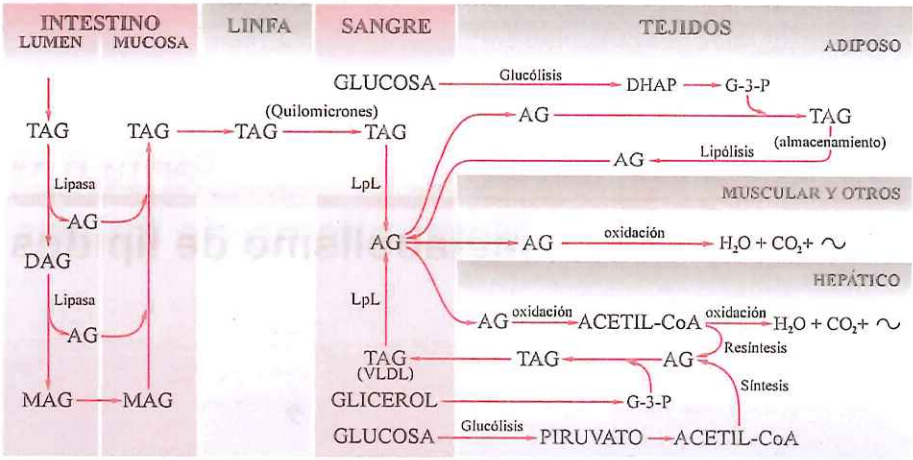


Fig. 15-1. Resumen del metabolismo de triacilgliceroles (TAG). DAG: diacilglicerol, MAG: monoacilglicerol, AG: ácido graso, DHAP: dihidroxiacetonafosfato, LpL: lipoproteína lipasa, VLDL: lipoproteína de muy baja densidad.

gradación de glicerofosfolípidos y esfingolípidos. El papel más importante de estas sustancias anfipáticas es estructural (constitución de membranas celulares). También contribuyen a estabilizar y mantener en suspensión lípidos hidrófobos en medios acuosos, por ejemplo, para asegurar su transporte en sangre (integran lipoproteínas del plasma) o para facilitar su digestión y absorción en intestino (participan en la formación de micelas).

Colesterol. Se estudiarán también la síntesis y excreción de colesterol, componente de membranas y precursor en la síntesis de ácidos biliares y hormonas esteroides.

LÍPIDOS SANGUÍNEOS

La tabla 15-1 muestra valores normales de la concentración de lípidos presentes en plasma sanguíneo humano después de 12 horas de ayuno.

Tabla 15-1. Concentración de lípidos en plasma sanguíneo normal (en mg por dL).

	Promedio	*Rango de variación*
Lípidos totales	540	315-670
Triacilgliceroles	140	80-170
Fosfolípidos	220	125-290
Colesterol total*	180	110-210

* El 70% del colesterol del plasma se encuentra esterificado con ácidos grasos y el 30% restante es colesterol libre.

En plasma existen también ácidos grasos libres (no esterificados), cuya concentración media es de 20 mg por dL. Se transportan principalmente asociados con albúmina, en proporción de 8 a 9 moléculas de ácidos grasos por molécula de proteína. Su vida media en plasma es de 2 a 3 minutos, lo cual indica un recambio muy activo. La mayor parte de estos ácidos grasos se genera por hidrólisis de grasas de depósito, movilizadas para su utilización en los tejidos.

LIPOPROTEÍNAS DEL PLASMA

La totalidad de lípidos del plasma se encuentra asociada en complejos lipoproteicos. Las partículas de lipoproteínas están formadas por una capa superficial de moléculas anfipáticas (proteínas, fosfolípidos y colesterol no esterificado) dispuestas con sus grupos hidrofílicos hacia el exterior, lo cual les permite mantenerse en dispersión e interactuar con enzimas y receptores de superficies celulares. En su interior el complejo contiene el material hidrofóbico (triacilgliceroles y ésteres de colesterol).

En el plasma existen varios tipos de lipoproteínas, diferentes entre sí en composición lipídica y proteica, en tamaño y densidad (pág. 61).

Como el espesor de la monocapa externa es similar en todas las lipoproteínas (alrededor de 2 nm), las diferencias en tamaño de las partículas se deben a variaciones del núcleo hidrofóbico,

responsable de la mayor parte de la masa total. A mayor diámetro, mayor contenido de lípidos neutros y, en consecuencia, menor densidad.

De acuerdo con su densidad, se distinguen cinco categorías principales de lipoproteínas, enumeradas a continuación en orden de densidad creciente (tamaño decreciente): a) quilomicrones, b) lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, del inglés *very low density lipoproteins*), c) lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, *intermediate density lipoproteins*), d) lipoproteínas de baja densidad (LDL, *low density lipoproteins*) y e) lipoproteínas de alta densidad (HDL, *high density lipoproteins*)*.

En general, los quilomicrones, encargados de transportar lípidos desde intestino hacia los tejidos, están relacionados exclusivamente con lípidos *exógenos*, ingresados por vía digestiva. Las restantes lipoproteínas están involucradas en transporte de lípidos *endógenos*, sintetizados en el organismo.

Los triacilglicéridos predominan netamente en quilomicrones y VLDL; en cambio, el núcleo de LDL y HDL está compuesto principalmente por ésteres de colesterol.

Apolipoproteínas. Se han identificado diez componentes proteicos designados con el apócope *apo* seguido de una letra; se agrega un número para distinguir miembros de una misma clase (tabla 15-2). Las más importantes desde el punto de vista clínico son apo A-I, B-48, B-100, C-II, E y apo (a). Las apo A son las principales proteínas en HDL, que también poseen apo C y E. Apo B-48 se encuentra en quilomicrones, apo B-100 en VLDL, IDL y LDL. Apo B-48 y B-100 son codificadas por el mismo gen, a partir del cual se sintetizan dos proteínas (ver pág. 444); la apo B-48 es idéntica a poco menos de la mitad inicial (48%) de la molécula de apo B-100. En el plasma se produce cesión de apo C y E de lipoproteínas HDL a quilomicrones y VLDL. Apo A, B-48 y B-100 permanecen en sus partículas de origen; no se intercambian.

Las apolipoproteínas cumplen funciones estructurales importantes en la biosíntesis y remodelación de partículas lipoproteicas. Apo A-I es necesaria para la síntesis y secreción de HDL. Todas las apolipoproteínas, excepto B-48, se sintetizan en hígado. Una pequeña proporción de apo A y la apo B-48 son producidas en intestino. Apo B-100 y B-48 son necesarias para la secreción de lipoproteínas ricas en triacilglicéridos (VLDL y quilomicrones respectivamente).

Algunas apolipoproteínas actúan como cofactores o activadores de enzimas comprometidas en el metabolismo de lipoproteínas. De particular importancia es apo C-II, activadora de *lipoproteína lipasa* (LpL), responsable de la hidrólisis intravascular de triacilglicéridos contenidos en quilomicrones y VLDL. Apo A-I estimula la actividad de *lecitina-colesterol aciltransferasa* (LCAT), que cataliza la esterificación de colesterol en HDL.

* El uso de las siglas del nombre en inglés es ampliamente aceptado y frecuente en la literatura médica.

Tabla 15-2. Lipoproteínas del plasma.

Clase	*Lípidos principales*	*Apolipoproteínas*	*Densidad*	*Diámetro (nm)*
Quilomicrones	Triacilglicéridos Ésteres colesterol (Dietarios)	AI, AII, AIV, B-48, CI, CII, CIII, E	< 0,95	100 - 500
Remanentes de quilomicrones	Ésteres colesterol (Dietarios)	B-48, E	< 1,006	> 30
VLDL	Triacilglicéridos (Endógenos)	B-100, CI, CII, CIII, E	< 1,006	30 - 80
IDL	Triacilglicéridos Ésteres colesterol (Endógenos)	B-100, E	1,006 – 1,019	25 - 35
LDL	Ésteres colesterol (Endógenos)	B-100	1,019 – 1,063	18 - 28
HDL_2	Ésteres colesterol Fosfolípidos (Endógenos)	AI, AII, CI, CII, CIII, E	1,063 – 1,125	9 - 12
HDL_3	Ésteres colesterol Fosfolípidos (Endógenos)	AI, AII, CI, CII, CIII, E	1,125 – 1,210	5 - 9

Las apolipoproteínas también juegan un papel crítico como ligandos de receptores celulares. Apo B-100 es responsable de la unión de LDL a sus receptores, presentes en todas las células; apo E es reconocida por receptores presentes en células hepáticas.

Metabolismo de lipoproteínas

Quilomicrones

Dentro de las células de la mucosa intestinal, los triacilglicéridos y una pequeña cantidad de colesterol son "empaquetados" en una capa de fosfolípidos, colesterol libre y apo B-48 para formar *quilomicrones*; en la formación y secreción de quilomicrones colabora la proteína microsomal de transferencia de triacilglicéridos (MTTP). Los lípidos comprenden 98 a 99% del peso total de la partícula y las proteínas sólo 1 a 2%. Los triacilglicéridos representan 88% del total de lípidos, fosfolípidos 8%, ésteres de colesterol 3% y colesterol libre 1%. En el núcleo hidrofóbico se incorporan también vitaminas liposolubles absorbidas en la luz intestinal. Los quilomicrones nacientes viajan en vesículas desde el complejo de Golgi a la membrana basolateral de los enterocitos, de donde son secretados por exocitosis al espacio intersticial; llegan a los capilares linfáticos, luego al conducto torácico y se vierten en la vena subclavia para alcanzar la circulación general. Las partículas, de 100 a 500 nm de diámetro, aparecen en sangre una hora después de la ingestión de grasas y continúan ingresando durante un tiempo. Se requiere un período de ayuno de más de ocho horas para su completa desaparición de la sangre. La presencia de quilomicrones durante el período de absorción (lipemia absortiva) otorga al plasma un aspecto turbio o lechoso. Los quilomicrones transportan alrededor de 100 g de triacilgliceroles y de 0,5 a 1 g de colesterol por día; obviamente, estas cifras varían según la ingesta de lípidos.

Al ingresar en la circulación, las partículas reciben apoproteínas C y E, transferidas desde HDL. En el endotelio de capilares sanguíneos, los quilomicrones interaccionan con *lipoproteína lipasa* (LpL), enzima activada por apo C-II, que cataliza la hidrólisis de triacilgliceroles contenidos en el interior de la partícula. Los ácidos grasos liberados pasan rápidamente a las células subyacentes. Los principales sitios de actividad LpL son los capilares de tejido adiposo, miocardio, músculo esquelético y glándula mamaria lactante. Los ácidos grasos captados se utilizan para sintetizar TAG y almacenarlos (tejido adiposo), oxidarlos y obtener energía (músculos esquelético y cardíaco) o para sintetizar TAG y secretarlos (glándula mamaria). El otro producto de la hidrólisis, glicerol, es tomado del plasma y metabolizado principalmente por hepatocitos.

La lipoproteína lipasa está unida a la pared del capilar por glicosaminoglicanos de tipo heparansulfato. La administración de heparina libera a la LpL de su anclaje a heparansulfato, efecto que explica el rápido aclaramiento del plasma lechoso postabsortivo producido por esa sustancia.

El proceso de lipólisis reduce notablemente el tamaño de los quilomicrones; la partícula pierde gran parte de su masa original, aumenta la proporción relativa de colesterol y la cubierta anfipática externa resulta grande. El exceso de fosfolípidos de superficie es transferido a HDL, a las cuales se le devuelven la proteína activante de LpL, apo C-II, y apo C-I, cuya función sería prevenir la interacción prematura de quilomicrones con receptores hepáticos. Como consecuencia de estos cambios, las partículas se convierten en *remanentes de quilomicrones*.

Después del proceso de lipólisis, los remanentes se disocian del endotelio capilar y vuelven a circular para ser captados por el hígado. Las partículas, relativamente enriquecidas en ésteres de colesterol, tienen apo B-48 y apo E como únicas proteínas. Los hepatocitos poseen receptores para apo E (llamados LRP, del inglés *LDL-receptor related protein*), que fijan los remanentes y los internan por endocitosis. Apo B-48, necesaria para la secreción de quilomicrones en intestino, no participa en su remoción. Aunque B-48 y B-100 son productos del mismo gen, B-48 carece de la mitad C-terminal de B-100, donde reside el dominio de unión a receptores LDL. La vida media de los quilomicrones en circulación es de menos de una hora. La figura 15-2 resume esquemáticamente las etapas descriptas.

Dentro de la célula hepática las vesículas endocíticas se unen a lisosomas, donde los remanentes son degradados. Los productos formados, colesterol, ácidos grasos y aminoácidos, se liberan en el citosol. El colesterol es utilizado en síntesis de ácidos biliares, o excretado como tal en la bilis; también puede ser reexportado a la sangre en partículas de VLDL. Los ácidos grasos son oxidados para obtener energía o utilizados en la síntesis de TAG.

Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)

Los triacilgliceroles sintetizados en hepatocitos son incorporados a partículas de VLDL, junto con ésteres de colesterol, que representan cer-

ca del 10% de la masa del núcleo hidrofóbico de las VLDL nacientes. La principal proteína en la cubierta anfipática es apo B-100. Las partículas completas son secretadas por exocitosis hacia los espacios de Disse, alcanzan la luz de capilares sinusoides y llegan al torrente sanguíneo, donde sufren cambios semejantes a los descriptos para quilomicrones. Primero las VLDL reciben apolipoproteínas C y E procedentes de lipoproteínas de alta densidad (HDL); luego son sometidas, en los capilares de tejidos extrahepáticos, a la acción de *lipoproteína lipasa* (LpL), activada por apo C-II. Además de la hidrólisis de sus TAG catalizada por LpL, las partículas intercambian TAG por ésteres de colesterol con las lipoproteínas de alta densidad (HDL). La partícula de VLDL pierde así gran parte de sus triacilglicéridos y se enriquece en colesterol; su tamaño disminuye, sobran fosfolípidos en la superficie, que son transferidos a HDL. A estos cambios sigue el retorno de apo-C II a HDL, con lo cual se interrumpe la acción de la LpL. Las modificaciones sufridas por las partículas de VLDL las convierten en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL). La vida media de VLDL es de unas 4 horas.

IDL. Son partículas con alto contenido de colesterol, en su mayor parte esterificado, y pequeña cantidad de TAG. Sus apoproteínas son B-100 y E. Receptores existentes en hepatocitos (LRP, proteína relacionada con receptores LDL) que unen apo E, captan más de la mitad de las partículas IDL en circulación y las internan por endocitosis. Como las IDL ya no poseen apo C-II, la LpL no actúa sobre sus TAG. Sin embargo, éstos siguen siendo hidrolizados por una *lipasa hepática*, enzima extracelular localizada en la pared de los capilares sinusoidales del hígado, insensible a regulación por apo C-II; la apo E es devuelta a HDL. Estos cambios convierten a las IDL en lipoproteínas de baja densidad (LDL). La permanencia de IDL en sangre varía entre 2 y 5 horas. Como es lógico, a mayor proporción de IDL captadas por el hígado, menor es el remanente final de LDL.

LDL. Estas partículas contienen en su interior prácticamente sólo colesterol esterificado y en su superficie apo B-100 como única proteína. Representan el producto final de las modificaciones experimentadas por VLDL desde su llegada a la sangre. Su vida media es de unos 2,5 días y su concentración normal promedio en plasma es 100 mg/dL (2,6 mmol/L)..

En la superficie de todas las células existen receptores específicos para apo B-100 (también llamados *receptores LDL*). Las LDL son captadas por esos receptores, introducidas por endocitosis y sus componentes hidrolizados por enzimas lisosomales (fig. 15-2). Los productos resultantes (aminoácidos,

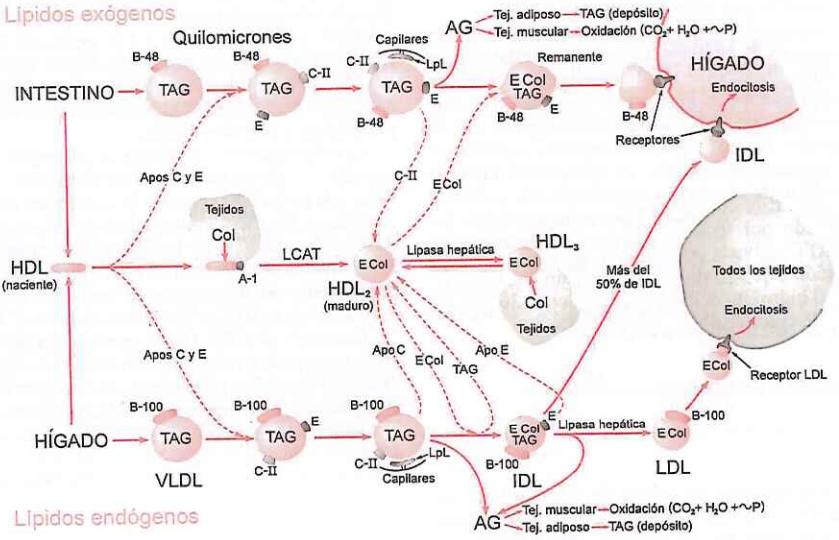


Fig. 15-2. Metabolismo de lipoproteínas del plasma. VLDL: lipoproteína de muy baja densidad, IDL: lipoproteína de densidad intermedia, LDL: lipoproteína de baja densidad, HDL: lipoproteína de alta densidad, TAG: triacilgliceroles, Col: colesterol libre, ECol: colesterol esterificado, LCAT: lecitina-colesterol aciltransferasa, LpL: lipoproteína lipasa.

colesterol y ácidos grasos) pasan al citosol. El colesterol es incorporado a membranas y, en algunas células (corteza suprarrenal, ovario, testículo), utilizado para síntesis de hormonas esteroides. El exceso es nuevamente esterificado en una reacción catalizada por *acil-CoA-colesterol-aciltransferasa* (ACAT) y almacenado en la célula. Los receptores LDL son reciclados a la membrana plasmática.

Lipoproteínas de alta densidad (HDL)

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son sintetizadas en hígado y, en menor proporción, en intestino. Las partículas nacientes, de forma discoide, son complejos de apolipoproteínas (A, C y E) y fosfolípidos, con predominio de fosfatidilcolina. Las HDL desarrollan diversas actividades:

Transferencia de apolipoproteínas. HDL contiene apos A, C y E. Las A son las principales proteínas de HDL y permanecen siempre unidas a estas partículas. Apo C y E son transferidas a quilomicrones y VLDL. De las apo C, la apo C-II es un factor activador de la LpL y cuando ha cumplido su misión retorna a las HDL. La apo E cedida a VLDL tiene un papel importante en la homeostasis de lípidos ya que regula el metabolismo de colesterol, triacilglicéridos y fosfolípidos en sangre y cerebro. Apo E regresa a HDL desde las IDL cuando estas han perdido casi todos sus triacilglicéridos.

Transporte invertido de colesterol. A través de la pared de capilares de tejidos extrahepáticos, las HDL interactúan con la membrana plasmática de células subyacentes, en un proceso en el cual interviene apo A-I y quizás otras apo A. Se ha propuesto la existencia de receptores específicos. El colesterol intracelular es movilizado hacia la superficie de la célula y transferido a la partícula de HDL. Este colesterol libre es rápidamente esterificado por *lecitina-colesterol-aciltransferasa* (LCAT), activada por apo A-I. El ácido graso en posición 2 de fosfatidilcolina (lecitina) es transferido al hidroxilo del C 3 del colesterol. Se forman éster de colesterol y lisofosfolípido.

$$\text{Colesterol} + \underset{\text{(Lecitina)}}{\text{Fosfatidilcolina}} \xrightarrow{\text{LCAT}} \text{Éster de colesterol} + \underset{\text{(Lisolecitina)}}{\text{Lisofosfatidilcolina}}$$

La adquisición de ésteres de colesterol por las partículas de HDL aumenta su tamaño y cambia la forma discoide en esférica. Estos ésteres de colesterol incorporados por las HDL pueden ser transferidos a lipoproteínas ricas en triacilgliceroles, VLDL y quilomicrones, cuyos remanentes son posteriormente captados por receptores hepáticos y retirados de circulación. Todo el proceso es denominado "*transporte invertido de colesterol*".

La transferencia de ésteres de colesterol desde HDL a VLDL y quilomicrones es mediada por la *proteína de transporte de ésteres de colesterol* (CETP, siglas del inglés *cholesterol ester transport protein*). En intercambio por el colesterol esterificado cedido a las lipoproteínas ricas en TAG, éstas entregan triacilgliceroles a las HDL. Los ésteres de colesterol son finalmente tomados por el hígado con los remanentes de quilomicrones y las IDL para completar el periplo del "transporte invertido de colesterol". Esta vía resulta en la transferencia neta de colesterol libre desde los tejidos periféricos al hígado, donde puede ser procesado para su excreción. Tres proteínas tienen roles importantes en este proceso: la LCAT, la apo A-I que la activa y la CETP.

Por otra parte, las HDL proveen colesterol a tejidos esteroidogénicos (por ej., corteza suprarrenal y gónadas). Para ello se unen a receptores especiales y transfieren colesterol a las células. No se produce endocitosis mediada por receptores, sino sólo cesión de colesterol.

HDL_2 y HDL_3. Se distinguen dos tipos principales de HDL, diferentes en tamaño y contenido de colesterol. Las partículas HDL_2 son más grandes y más ricas en colesterol que las HDL_3. Debido a la transferencia de ésteres de colesterol a VLDL y quilomicrones y a la posterior hidrólisis de los TAG por acción de lipasa hepática, las HDL_2 se convierten en HDL_3, pequeñas, con capacidad para adquirir más colesterol en células periféricas y regenerar HDL_2.

Concentraciones en plasma de 60 mg/dL (1,6 mmol/L) o superiores son deseables, pues HDL bajas son un índice de riesgo de accidentes cardiovasculares. En casos clínicos de hipertriacilgliceridemia (altos niveles de VLDL) se han observado bajos niveles de colesterol de HDL, probablemente por aumento del intercambio de ésteres de colesterol y TAG entre HDL y lipoproteínas ricas en TAG.

Remoción de HDL. Una pequeña proporción de HDL es captada y retirada de circulación por receptores LRP (proteína relacionada con receptor LDL) y, al parecer, por receptores de LDL en hepatocitos, que también reconocerían la apo E. El colesterol de estas HDL ingresa al hígado y es finalmente excretado como tal o transformado en ácidos biliares.

Lipoproteína (a)

En plasma humano existe, además de las lipoproteínas descriptas, otra fracción similar a

LDL en composición lipídica, pero diferente en la porción proteica. La lipoproteína (a) [lp(a)] contiene la apo B-100 presente en LDL más una glicoproteína de masa molecular entre 300 y 800 kDa, llamada apo (a), que se une a B-100 por un puente disulfuro. Como la lipoproteína (a) tiene proporcionalmente más proteína que la LDL, su densidad es mayor.

La estructura primaria de apo (a) tiene homología con la del plasminógeno (véase coagulación de la sangre, pág. 701), perteneciente a la familia de serina-proteasas.

La concentración de lipoproteína (a) en plasma varía en diferentes individuos. Se ha establecido una estrecha relación entre niveles elevados de lp(a) e incidencia de aterosclerosis y accidentes cardiovasculares. Un valor mayor de 40 mg por dL es importante índice de riesgo de enfermedad coronaria, especialmente si se asocia con aumento de LDL y colesterol total.

Receptores

Receptor LDL. Se encuentra en casi todas las células; reconoce como ligando a la apoproteína B-100, presente en VLDL, IDL y LDL. También se fijaría apo-E.

El receptor LDL es una proteína integral de membrana de 115 kDa, con cinco segmentos funcionalmente diferenciados: *Dominio 1*. Extremo N-terminal, de 280 aminoácidos, proyectado hacia el exterior de la célula, en él se encuentra el lugar de unión a la apo B-100. Es rico en cisteínas que forman uniones disulfuro, lo que da estabilidad a la molécula y en restos glutamato y aspartato que le permiten atraer e interactuar con un sitio con cargas positivas en el dominio C-terminal de B-100. *Dominio 2*. Secuencia homóloga a la del precursor de factor de crecimiento epidérmico, tiene dos cadenas N-oligosacarídicas. *Dominio 3*. Rico en serinas y treoninas que ofrece sitios de glicosilación. *Dominio 4*. Hélice α de 22 restos aminoacídicos predominantemente hidrofóbicos, atraviesa el espesor de la bicapa lipídica de membrana plasmática. *Dominio 5*. Extremo C-terminal, de 50 aminoácidos, inmerso en el citosol. A este segmento se debe la capacidad del receptor de desplazarse lateralmente en la membrana y agruparse en las invaginaciones revestidas que serán endocitadas.

La síntesis de receptores LDL es regulable; cuando aumenta el colesterol intracelular se inhibe la producción de receptores (este fenómeno es designado, en inglés, *down regulation*).

Receptor de remanentes. Ha sido designado *proteína relacionada con receptor LDL* (LRP); su ligando principal es apo E. La apo C-I inhibe la unión y captación prematura de quilomicrones y VLDL. Es abundante en hígado, cerebro y placenta. Su síntesis no es afectada por los niveles intracelulares de colesterol.

Receptor "recolector de residuos" (en inglés *scavenger*). Es menos específico que los anteriores. Estos receptores, distintos del receptor LDL, fijan LDL modificadas químicamente. Juegan un papel importante en la captación, por macrófagos, de lipoproteínas alteradas. Su síntesis no es regulable como la de receptores LDL.

Receptor de HDL. Se ha postulado su presencia en células adiposas, endotelio vascular, tejidos esteroidogénicos y fibroblastos. Ligan apoproteínas A-I, A-II y A-IV. La interacción de HDL con el receptor inicia un sistema de señales que promueve la transferencia de colesterol intracelular a la membrana plasmática y desde allí a HDL (en sentido inverso en tejidos esteroidogénicos). Su función es crítica en el "transporte invertido de colesterol", que elimina el exceso de colesterol de células extrahepáticas.

Lipoproteínas y aterosclerosis

El estudio del metabolismo de lipoproteínas es un tema del mayor interés médico, dada su relación con el desarrollo de aterosclerosis. Esta condición patológica es actualmente la principal causa de mortalidad en humanos. Se caracteriza por la formación, en paredes arteriales, de placas (ateromas) compuestas por acúmulos de colesterol, restos celulares, células musculares lisas y fibras de tejido conjuntivo, que disminuyen la luz y elasticidad del vaso. El avance de la lesión favorece la producción de coágulos intravasculares que terminan por obstruir la arteria, con consecuencias muy serias, como infarto de miocardio o accidentes cerebrovasculares.

Las causas de la enfermedad no están del todo aclaradas; sin embargo, se conocen factores llamados "de riesgo", que contribuyen decididamente a su génesis y progresión. Se consideran factores primarios: hipercolesterolemia, hipertensión arterial, hábito de fumar y diabetes. Secundarios: estrés, dietas ricas en grasas animales (alto contenido de ácidos grasos saturados y colesterol), obesidad y falta de ejercicio.

Es común el desarrollo de aterosclerosis en individuos con alteraciones en los lípidos plasmáticos (dislipidemias). Niveles elevados de LDL, y por ende de colesterol, y aumento de lipoproteínas ricas en triacilglicéridos incrementan la tendencia a la producción de ateromas, favorecida también por factores mecánicos o cito-

tóxicos (por ejemplo, hipertensión o compuestos derivados de la combustión de tabaco). Factores genéticos juegan un papel de gran importancia.

El proceso de formación de placas de ateroma es complejo; podría resumirse del modo siguiente: La iniciación puede deberse a alguna alteración del endotelio vascular causada por estrés mecánico (por ej., hipertensión) o productos tóxicos, que estimulan la expresión de proteínas (por ej., la *molécula-1 de adhesión celular vascular*, VCAM-1) que promueven la atracción y adherencia de monocitos y linfocitos T e infiltración de plaquetas en el área afectada. Las LDL penetran en la íntima a través de poros del endotelio vascular y se unen a proteoglicanos de la matriz extracelular. A mayor cantidad de LDL circulante, mayor su acúmulo y persistencia en el vaso. La permanencia de lipoproteínas próximas al endotelio las hace pasibles de modificaciones, entre ellas, oxidación promovida por especies reactivas de oxígeno (ion superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo, ver pág. 190). Los agentes oxidantes pueden activar a monocitos y linfocitos, que liberan citoquinas iniciadoras de una reacción inflamatoria. Actualmente se asigna gran importancia al proceso inflamatorio en la patogénesis de la aterosclerosis.

Los monocitos son atraídos hacia el sitio de acumulación de LDL alteradas, donde se convierten en macrófagos, que fijan lipoproteínas a sus receptores "recolectores de residuos" o *scavengers*. Las LDL son internadas en los macrófagos, degradadas, su colesterol es esterificado por acilcolesterol-aciltransferasa (ACAT) y almacenado en las células. Como los receptores "recolectores de residuos" no son regulados por los niveles de colesterol intracelular, la captación continúa mientras existan en el medio LDL modificadas. El citoplasma de los macrófagos se llena de gotitas oleosas de ésteres de colesterol, que dan a las células un aspecto al cual deben el nombre de "*espumosas*". Las agrupaciones de células espumosas son visibles como "estrías grasas". Al mismo tiempo, las plaquetas liberan factores de crecimiento que estimulan la proliferación de células de músculo liso de la capa arterial media y la producción de colágeno y elastina, responsables de fibrosis y rigidez vascular. Las células espumosas mueren y liberan ésteres de colesterol que forman una masa oleosa. La agregación de plaquetas favorece la eventual formación de coágulos sobre la lesión.

La relación entre lipoproteínas y aterosclerosis ha sido motivo de numerosos estudios. Las evidencias actuales señalan como factores de riesgo el incremento de los niveles plasmáticos de LDL, colesterol total, triacilglicéridos y lipoproteína (a) y la disminución de colesterol de HDL. El colesterol contenido en las HDL es vulgarmente llamado "bueno", en contraposición con el "malo" de las LDL.

La concentración de LDL en sangre guarda relación con el número de receptores para apo B-100 (receptores LDL) en las células. Se produce aumento de LDL en plasma cuando hay reducción primaria o secundaria de receptores específicos. La reducción primaria de receptores de origen genético es la causa del cuadro de *hipercolesterolemia familiar*.

Hipercolesterolemia familiar. Se han identificado numerosas mutaciones en el gen que controla la síntesis de receptores LDL. Esas mutaciones pueden determinar deficiencias en la remoción de LDL de la circulación por: a) ausencia o déficit de producción de receptores; b) falla en los mecanismos de transporte vesicular intracelular e inserción en la membrana plasmática de los receptores; c) capacidad alterada o disminuida de los receptores para fijar LDL o para reunirse en los hoyos revestidos de la membrana y ser internados por endocitosis.

En la forma homocigota de la enfermedad, con ausencia de receptores LDL en las células, la concentración de LDL (y colesterol) en sangre aumenta enormemente (hasta 6 veces por encima del nivel normal). En heterocigotas para esta condición hay disminución de la cantidad de receptores LDL; los niveles de LDL y colesterol en plasma pueden alcanzar valores dos o más veces más elevados que los normales. Estos pacientes padecen aterosclerosis a edad temprana y presentan gran incidencia de accidentes vasculares. El estudio de este trastorno hereditario ha probado la importancia de los receptores para la remoción de LDL de la circulación y el mantenimiento de su concentración normal.

Aun en personas sin el defecto genético mencionado, el nivel de LDL (y colesterol) en sangre aumenta con la edad. Este fenómeno refleja incremento en la producción de LDL y/o disminución de receptores para LDL, con la consiguiente reducción de la capacidad para retirar esas lipoproteínas de circulación.

También se ha comprobado relación directa entre nivel de *lipoproteína* (a) e incidencia de aterosclerosis. La comprobación de concentración elevada de lp(a) tiene valor predictivo de enfermedad coronaria.

En cambio, existe relación inversa entre concentración de colesterol de HDL y aterosclerosis. A mayor nivel de HDL, particularmente HDL_2, menor riesgo de padecer accidentes vasculares. Probablemente el papel de HDL en la remoción de colesterol de células extrahepáticas ("transporte invertido") explique este hecho.

Hipertriacilgliceridemia. Se observa en personas con incapacidad para hidrolizar los TAG contenidos en quilomicrones y VLDL por defectos genéticos que afectan la síntesis de lipoproteína lipasa (LpL) o de apo C-II, factor necesario para la actividad de LpL.

Se han detectado también cuadros de hipercolesterolemia e hipertriacilgliceridemia debidos a falla en la captación de remanentes de quilomicrones y de IDL. La causa más común de este tipo de hiperlipemia es la deficiencia de apo E. Generalmente se observa acumulación de VLDL.

Menos frecuentes son los cuadros de hipolipemias primarias, entre ellos la *abetalipoproteinemia* debida a fallas en la síntesis de B-100 y B-48. En estos casos los niveles de lípidos en plasma son muy bajos pues no pueden formarse quilomicrones y VLDL. También están reducidas las concentraciones de IDL y LDL.

Existe otra condición hereditaria, llamada *enfermedad de Tangier*, en la cual hay marcada disminución de HDL. Se produce acumulación de colesterol en las células y aumento de TAG en plasma. Disminuyen los niveles de apos A-I y E y la captación de remanentes de quilomicrones e IDL se reduce.

LÍPIDOS DE TEJIDOS

Los lípidos corporales se distinguen, de acuerdo con su distribución tisular y funciones, en: a) lípidos de depósito y b) lípidos constitutivos de órganos y tejidos.

a) *Lípidos de depósito*. Se encuentran principalmente en el tejido adiposo del celular subcutáneo y en el que rodea algunos órganos. Contiene alrededor de 90% de grasas neutras y muy pequeña cantidad de colesterol y lípidos complejos. Los ácidos grasos más abundantes en los triacilglicéridos del tejido adiposo son: oleico, palmítico, linoleico, esteárico y mirístico.

Su principal función es servir de reserva energética. Cuando el aporte de alimentos excede las necesidades calóricas, el sobrante se deposita en forma de grasa. Sólo los triacilgliceroles pueden ser almacenados en grandes cantidades. Los glúcidos también se depositan en forma de glucógeno, pero la capacidad de este almacenamiento es comparativamente muy reducida.

La grasa de depósito se moviliza y degrada cuando las necesidades energéticas lo requieren. Una lipasa intracelular regulada por hormonas cataliza la hidrólisis de TAG para dar glicerol y ácidos grasos. Los ácidos grasos liberados llegan por la circulación a los tejidos que los utilizan.

La síntesis y degradación de grasas de depósito son procesos dinámicos. Se estima que la reserva total de TAG se renueva cada 2 o 3 semanas.

Otras funciones secundarias de las grasas de depósito son actuar como aislante térmico y servir de cubierta protectora o sostén de órganos (por ej., riñón).

b) *Lípidos constitutivos*. Están representados en su casi totalidad por lípidos complejos y colesterol; prácticamente no incluyen triacilgliceroles. Forman parte de membranas y otras estructuras celulares. En condiciones normales, fosfolípidos, glucolípidos y colesterol no se acumulan; participan en proporciones relativamente constantes en la composición de los tejidos.

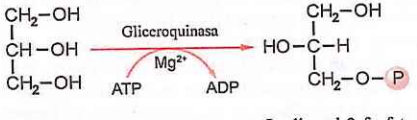
METABOLISMO DE GRASAS

Los triacilgliceroles deben ser hidrolizados totalmente antes de su utilización por los tejidos. Gran parte de esta hidrólisis afecta a grasas de depósito en tejido adiposo. Hay permanente degradación (lipólisis) de triacilgliceroles de reserva catalizada por lipasas intracelulares, cuya actividad es regulada para adecuarla a las necesidades del organismo. Los productos formados (ácidos grasos y glicerol) se liberan hacia el plasma, en el cual los ácidos grasos se unen a albúmina.

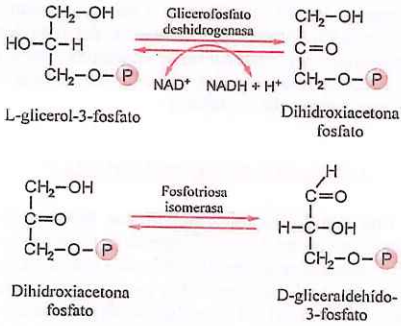
Los triacilgliceroles exógenos, transportados por quilomicrones, y los endógenos, vehiculizados por lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), son hidrolizados en capilares por acción de la lipoproteína lipasa; los ácidos grasos liberados penetran en las células para su utilización. La hidrólisis de grasas, tanto las de depósito como las transportadas por lipoproteínas, libera además glicerol, que es captado por las células capaces de metabolizarlo.

Metabolismo del glicerol

La utilización de glicerol exige activación previa por fosforilación, razón por la cual sólo metabolizan glicerol libre los tejidos que poseen *gliceroquinasa*. Esta enzima se encuentra en hígado, riñón, intestino y glándula mamaria lactante. Cataliza la conversión del glicerol en L-glicerol-3-fosfato; el grupo fosfato es cedido por ATP. La reacción es prácticamente irreversible.



El glicerol-3-fosfato es transformado en dihidroxiacetonafosfato, una de las triosas fosfato de la vía de Embden-Meyerhof, por acción de *glicerofosfato deshidrogenasa*, enzima ligada a NAD. Según se indicó al considerar las etapas de la glucólisis, la dihidroxiacetonafosfato es convertida en gliceraldehído-3-fosfato en reacción catalizada por *fosfotriosa isomerasa*.



Las dos reacciones son reversibles; las mismas etapas permiten obtener glicerol-3-fosfato a partir de triosas fosfato.

La posibilidad de formar triosas fosfato ofrece al glicerol una vía para su total degradación en el camino de la glucólisis y ciclo del ácido cítrico. Por otra parte, puede también remontar la vía gluconeogénica y formar glucosa o glucógeno.

El glicerol-3-fosfato es un metabolito importante en vías de síntesis de triacilgliceroles y glicerofosfolípidos.

CATABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS

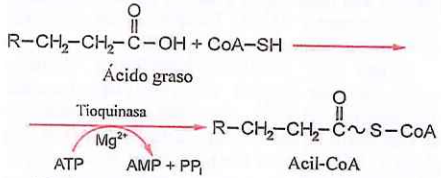
Muchos tejidos, en especial muscular esquelético y adiposo, y órganos como hígado, riñón y corazón, tienen capacidad para oxidar ácidos grasos de cadena larga.

Como la gran mayoría de ácidos grasos naturales posee número par de carbonos, desde hace mucho se suponía que los ácidos grasos se deben sintetizar o degradar en el organismo por adición o sustracción, respectivamente, de restos de dos carbonos. Esto ha sido ampliamente confirmado. El principal proceso de degradación comprende la oxidación en el carbono β del ácido graso (de allí el nombre de β-oxidación). Están involucradas en la β-oxidación enzimas localizadas en la matriz mitocondrial. La proximidad con la cadena respiratoria facilita la transferencia de equivalentes reductores y la producción de ATP por fosforilación oxidativa.

Antes de iniciar el proceso de oxidación deben cumplirse dos etapas preparatorias: a) activación del ácido graso y b) transporte al interior de las mitocondrias.

Activación de ácidos grasos. La etapa inicial es la formación de un compuesto altamente reactivo con capacidad para participar en las transformaciones subsiguientes.

La reacción es catalizada por *tioquinasa* o *acil-CoA sintetasa* en presencia de coenzima A, ATP y Mg^{2+}. Se hidroliza ATP en la segunda unión fosfato, con producción de AMP y pirofosfato inorgánico (PP_i), es decir, se consumen las dos uniones de alta energía del ATP. El ácido graso se une a coenzima A mediante un enlace tioéster rico en energía. Se forma acil-CoA, o *ácido graso activo*.



El pirofosfato formado se hidroliza rápidamente por acción de *pirofosfatasa*, por lo cual la activación de ácidos grasos es un proceso irreversible. En todas las reacciones en las cuales se forma pirofosfato inorgánico, la rápida remoción de éste por hidrólisis determina la irreversibilidad de la reacción principal.

La activación de ácidos grasos se realiza en el citosol, mientras la oxidación transcurre dentro de las mitocondrias. Como la membrana interna de estas organelas es impermeable a acil-CoA, se requiere un mecanismo de transferencia a la matriz.

Transferencia de acil-CoA de citosol a matriz mitocondrial. El acilo del acil-CoA es transferido a *carnitina* o β-hidroxi-γ-trimetilamoniobutirato (pág. 608), compuesto sintetizado en

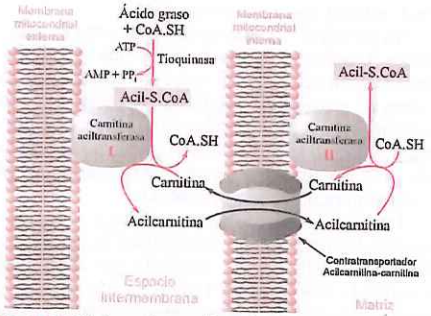


Fig. 15-3. Sistema de transferencia de acil-CoA desde el citosol a la matriz mitocondrial (papel de la carnitina).

hígado y riñón a partir de lisina. Se forma acil-carnitina, que es transportada a la matriz mitocondrial (fig. 15-3).

El sistema comprende dos enzimas, *carnitina-aciltransferasa I*, ubicada en la membrana externa de mitocondrias y *carnitina-aciltransferasa II*, en la membrana interna, y un contratransportador acilcarnitina/carnitina (fig. 15-4). Los acil-CoA y la carnitina ingresan en el espacio intermembrana por poros de la membrana externa.

La carnitina-aciltransferasa I (CAT I) cataliza la reacción:

$$\text{Acil-SCoA} + \text{Carnitina} \xrightleftharpoons{\text{CAT I}} \text{Acil-Carnitina} + \text{CoA-SH}$$

El resto acilo se une por enlace tipo éster al hidroxilo del carbono β de la carnitina. Este enlace es de alta energía, como la unión tioéster de acil-CoA.

La acil-carnitina pasa a la matriz, donde transfiere el acilo a CoA-SH para regenerar acil-CoA. La reacción es catalizada por carnitina-aciltransferasa II (CAT II):

$$\text{Acil-Carnitina} + \text{CoA-SH} \xrightleftharpoons{\text{CAT II}} \text{Acil-SCoA} + \text{Carnitina}$$

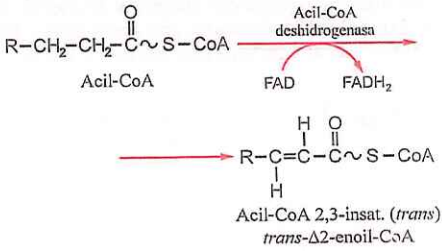
En la membrana interna existe un contratransportador que introduce acilcarnitina en la matriz mitocondrial y expulsa carnitina hacia el citosol. Los ácidos grasos de menos de 12 C ingresan en la matriz mitocondrial sin necesidad de ser transferidos a carnitina.

Deficiencia de carnitina. Se observa en niños prematuros que no han alcanzado capacidad para sintetizarla y en pacientes con aciduria orgánica (ácidos orgánicos en orina) o enfermedad renal y pérdida de carnitina por orina. En estos casos se alteran la oxidación de ácidos grasos, la cetogénesis y la gluconeogénesis. Hay aumento de ácidos grasos en plasma e hipoglucemia.

β-oxidación

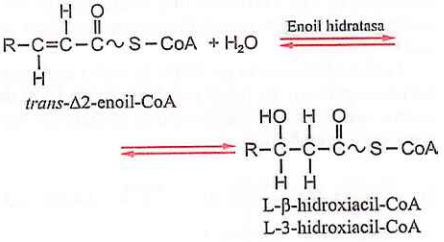
El acil-CoA inicia en la matriz el proceso de oxidación. Este comprende una serie de cuatro reacciones que producen liberación de acetil-SCoA y acortamiento en dos carbonos de la cadena del acilo. La degradación se repite tantas veces como sea necesario para reducir toda la cadena a segmentos de dos carbonos. Las reacciones de cada serie son las siguientes:

1. **Primera oxidación.** El acil-coenzima A sufre pérdida de dos hidrógenos de los carbonos α y β (2 y 3). Esta deshidrogenación es catalizada por *acil-CoA deshidrogenasa*, con FAD como aceptor de hidrógenos. Se forma un derivado acil-CoA α-β (o 2-3) insaturado, de configuración *trans*.

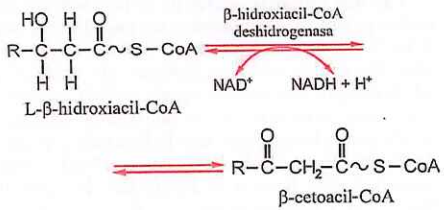


Existen tres isozimas de acil-CoA deshidrogenasa. Una actúa sobre ácidos grasos de cadena larga (más de 12 C), otra sobre ácidos grasos de 6 a 12 C y una tercera para ácidos de 4 a 6 C. La oxidación completa de un ácido graso de cadena larga requiere participación de las tres isozimas.

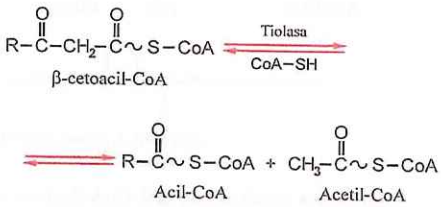
2. **Hidratación.** Se agrega agua para saturar el doble enlace y formar β-hidroxiacil-CoA (o 3-hidroxiacil-CoA). La reacción es catalizada por *enoil hidratasa*, también llamada *crotonasa*.



3. **Segunda oxidación.** El β-hidroxi derivado sufre una nueva deshidrogenación en el carbono β para formar el correspondiente β-ceto-acil-CoA. La *β-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa* es responsable de esta reacción; el aceptor de hidrógenos es NAD.



4. **Ruptura de la cadena y liberación de acetil-CoA.** Finalmente el β-cetoacil-CoA es escindido a nivel de la unión entre los carbonos α y β por acción de tiolasa (cetotiolasa). Esta reacción tiolítica requiere otra molécula de coenzima A. Los productos formados son acetil-CoA y un acil-CoA de dos carbonos menos que el inicial.

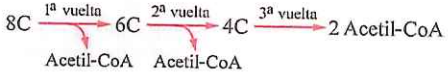


Para los ácidos grasos de cadena de 12 o más carbonos, las enzimas que catalizan las tres últimas etapas (reacciones 2, 3 y 4), se encuentran localizadas en una misma proteína trifuncional.

La serie de reacciones comprendidas en la β-oxidación se resume en la figura 15-4.

La oxidación se repite con el acil-CoA resultante hasta degradarlo completamente a acetatos activos. Si bien las cuatro etapas del ciclo se repiten en cada vuelta, el sustrato que inicia la siguiente es dos carbonos más corto que el precedente. La última se inicia con un acil-CoA de cuatro carbonos.

La β-oxidación de un ácido de ocho carbonos (ácido caprílico) da lugar a la formación final de cuatro acetil-CoA y requiere tres vueltas de esta secuencia metabólica:



Un ácido graso de 16 carbonos (palmítico) será degradado a 8 acetatos activos después de siete etapas de β-oxidación.

Los acetil-CoA generados en la degradación oxidativa de ácidos grasos ingresan al ciclo del ácido cítrico para su oxidación final a CO_2 y H_2O.

Las tres primeras etapas de la β oxidación de ácidos grasos son similares a las tres últimas del ciclo del ácido cítrico (desde succinato a oxaloacetato). En ambos casos se produce una oxidación catalizada por una enzima ligada a FAD, con formación de un compuesto no saturado de configuración *trans*; luego sigue una hidratación y posteriormente otra oxidación, esta vez con NAD como coenzima, que lleva a la formación de cetoacil (fig. 15-5). La cuarta etapa de la β- oxidación, en cambio, no tiene similar en el ciclo de Krebs.

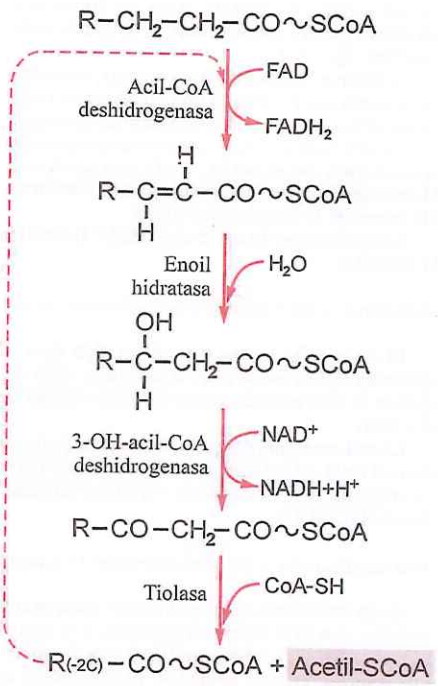


Fig. 15-4. Etapas de la β-oxidación de un ácido graso (R indica el grupo alquilo; el ácido graso ha sido activado por unión a CoA-SH). Se indican las cuatro etapas de cada vuelta de β oxidación, cuyos productos son acetil-CoA y un acil-CoA con 2C menos que el que inició la serie de 4 reacciones. El proceso se repite tantas veces como sea necesario para degradar toda la cadena del acilo en segmentos de 2C. En la última vuelta ingresa un resto acilo de 4C y se forman 2 acetil-CoA.

Los ácidos grasos de cadena con número impar de carbonos también son sometidos a β-oxidación. Al terminar, ingresa un acil-CoA de 5 C y los productos finales son acetil-CoA y propionil-CoA. El propionil-CoA es el único producto del catabolismo de ácidos grasos que puede ingresar en la gluconeogénesis.

Defectos genéticos. Existe una falla en el catabolismo de ácidos grasos debida a una mutación en el gen que codifica la deshidrogenasa de acil-CoA de cadena mediana. Los individuos homocigotas son incapaces de oxidar ácidos grasos de 6 a 12 carbonos. La enfermedad tiene mayor incidencia en los países del norte de Europa.

Se caracteriza por un cuadro patológico que comprende somnolencia, vómitos, hipoglucemia, hiperamoniemia y coma. Hay acumulación de

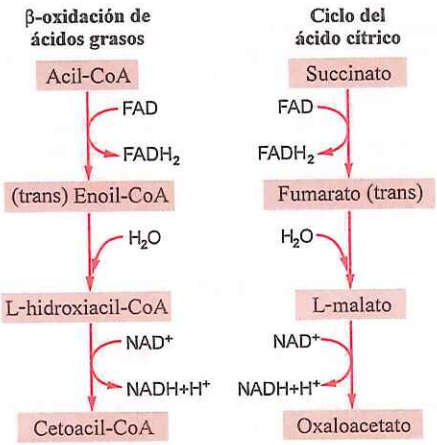


Fig. 15-5. Semejanza entre etapas de β-oxidación de ácidos grasos y del ciclo del ácido cítrico.

grasas en hígado, altos niveles de ácido octanoico en sangre, excreción urinaria elevada de ácidos dicarboxílicos de 6 a 10 carbonos y reducida de cuerpos cetónicos. Sin tratamiento, del 30 al 60% de estos pacientes mueren a edad temprana (2 o 3 años). El pronóstico mejora notablemente si se hace el diagnóstico precozmente, se instituye una dieta muy pobre en grasas y rica en carbohidratos y se acortan los intervalos entre comidas para evitar que el organismo recurra a sus reservas de grasas como fuente energética.

Mucho menos frecuentes son otros defectos, como la pérdida de la actividad de β-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa.

Otras vías de oxidación

Oxidación de ácidos grasos en peroxisomas. Los ácidos grasos de cadena muy larga no inician su oxidación en mitocondrias sino en organelas llamadas *peroxisomas*. El proceso es una β-oxidación diferente a la descripta; las enzimas involucradas son distintas de las de mitocondrias y codificadas por otros genes. a) El acil-CoA ingresa en los peroxisomas sin necesidad de la "lanzadera" de carnitina. b) Los ácidos son sometidos a varias vueltas de oxidación y acortados en 8 a 10 C. Los acilos remanentes completan su degradación en mitocondrias. c) Se forma $FADH_2$ que no cede H a la cadena respiratoria sino directamente a oxígeno molecular para formar H_2O_2. Este es convertido en agua y O_2 por la catalasa peroxisomal. d) No hay formación de enlaces de alta energía.

Los peroxisomas son el sitio exclusivo de oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga y de cadena ramificada (por ej., ácido fitánico). También contienen enzimas de la vía de síntesis de plasmalógenos y ácidos biliares.

Se han descripto varias enfermedades debidas a defectos genéticos relacionados con los peroxisomas. Algunos alteran la biogénesis de estas organelas por falla de los mecanismos de importación de proteínas. A este grupo pertenecen varias condiciones hereditarias, desde la más grave, *síndrome de Zellweger*, hasta la más leve *enfermedad de Refsum infantil*. En el primero los pacientes presentan severas lesiones neurológicas que en muchos casos determinan la muerte poco después del nacimiento. Están ausentes sistemas enzimáticos peroxisomales, lo que provoca aumento de ácidos grasos de cadena muy larga y de ácido fitánico en plasma y deficiencias en la síntesis de plasmalógenos. Otras enzimas peroxisomales, como la catalasa, se encuentran libres en el citosol.

Existen otros defectos genéticos que afectan a una proteína lisosomal, por ej., la adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X, en la cual falta el transportador ABC de ácidos grasos.

α- y ω-oxidación. Producen oxidación y separación de un carbono en uno de los extremos de la cadena. Son vías de escasa importancia en el catabolismo de ácidos grasos. Sin embargo, fallas genéticas que producen ausencia de la enzima de α-oxidación, determinan alteraciones neurológicas muy serias (enfermedad de Refsum).

Oxidación de ácidos grasos insaturados

El proceso de β-oxidación descripto se aplica a ácidos grasos saturados. Los insaturados cumplen las mismas etapas en vueltas sucesivas, con liberación de unidades de acetil-CoA. Sin embargo, como los ácidos grasos insaturados naturales tienen configuración *cis* en sus dobles enlaces y el intermediario de la β oxidación (enoil-CoA) es de forma trans, cuando el proceso alcanza a los carbonos unidos por doble ligadura se requieren enzimas adicionales para modificar la disposición estérica. Los ácidos grasos monoetilénicos necesitan la intervención de una *isomerasa* (Δ^3, Δ^2-enoil-CoA isomerasa) para modificar la posición y configuración del doble enlace. En ácidos grasos poliinsaturados, además de la enoil-CoA isomerasa, se requiere una 2,4-dienoil-CoA reductasa.

Balance energético de la oxidación de ácidos grasos

Durante la β-oxidación hay dos etapas (1 y 3) en las cuales se transfieren hidrógenos; en la 1 el aceptor es FAD; en la 3 es NAD. El transporte de un par de electrones en la cadena respiratoria produce, por fosforilación oxidativa, de 1,5 a 2 uniones de alta energía en el primer caso y de 2,5 a 3 en el segundo (para simplificar los cálculos, utilizaremos los factores 2 y 3 respectivamente).

Por ejemplo, el ácido caprílico requiere tres vueltas de β oxidación para su completa degradación a acetil-CoA; se producen 15 moles de ATP por mol de ácido (5 × 3). Como se utilizan dos uniones de alta energía en la activación inicial, el balance es 15 – 2 = 13 moles de ATP.

Se forman 4 moles de acetil-CoA, oxidables en el ciclo del ácido cítrico. En esta vía, cada acetato activo produce 12 ATP (pág. 274).

La tabla 15-3 muestra balances correspondientes a la oxidación total de ácido caprílico (8 carbonos) y ácido palmítico (16 carbonos). Un mol de ácido caprílico genera 61 moles de ATP y un mol de ácido palmítico, 129.

Asignando a la hidrólisis de una unión ~P de ATP una energía libre de –7,3 kcal/mol (–30,5 kJ/mol), el total de energía retenida en la oxidación de un mol de ácido caprílico es de 445,3 kcal (1.863 kJ) y en la de un mol de ácido palmítico, 941,7 kcal (3.940 kJ).

La energía liberada en la combustión completa de ácido palmítico en una bomba calorimétrica alcanza a 2.340 kcal/mol (9.790 kJ/mol). El rendimiento del catabolismo oxidativo en el organismo es de alrededor del 40%, similar a la eficiencia del aprovechamiento energético de la glucosa.

Las cifras expuestas indican la importancia de los ácidos grasos como combustibles. En hígado, corazón y músculo esquelético en reposo, la oxidación total de ácidos grasos provee más del 50% de los requerimientos energéticos.

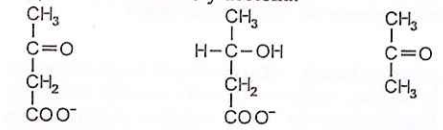
Tabla 15-3. Balance energético de la oxidación total de ácidos grasos

Ácido Caprílico (8 carbonos)	*Uniones ~P*
Consumo para activación inicial	–2
Producción en la β oxidación Tres vueltas (5×3)	+15
Producción por oxidación en el ciclo De Krebs (4 acetil-CoA) (12×4)	+48
Total	61
Un mol de ácido caprílico genera 61 moles de ATP.	
Ácido Palmítico (16 carbonos)	*Uniones ~P*
Consumo para activación inicial	–2
Producción en la β oxidación Siete vueltas (5×7)	+35
Producción por oxidación en el ciclo de Krebs (8 acetil-CoA) (12×8)	+96
Total	129
Un mol de ácido palmítico genera 129 moles de ATP.	

CETOGÉNESIS

La cetogénesis o formación de *cuerpos cetónicos* es una vía catabólica alternativa para acetatos activos, cuya magnitud es reducida en individuos normales, pero adquiere importancia en determinadas condiciones metabólicas.

Se denominan cuerpos cetónicos al acetoacetato, 3-hidroxibutirato y acetona.

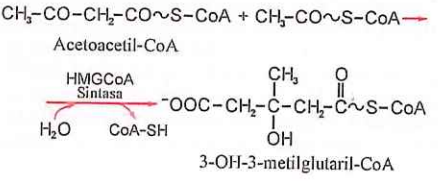


La síntesis de estos compuestos se realiza en mitocondrias de hígado a partir de acetil-CoA. El proceso comprende varias etapas:

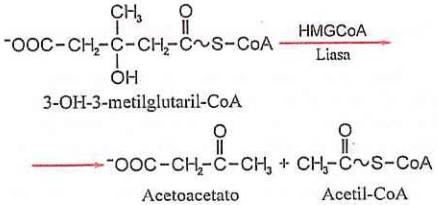
1. **Formación de acetoacetil-CoA.** Dos moléculas de acetil-CoA se unen, en reacción catalizada por *tiolasa*, para formar acetoacetil-CoA:

El acetoacetil-CoA es también el producto resultante, junto con acetil-CoA, del penúltimo ciclo de β-oxidación de ácidos grasos.

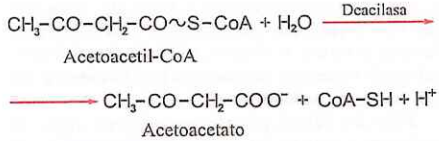
2. **Formación de 3-OH-3-metilglutaril-CoA.** El acetoacetil-CoA reacciona con acetil-CoA para dar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMGCoA) que es también intermediario en la biosíntesis de colesterol. Cataliza esta etapa la *3-OH-3-metilglutaril-CoA sintasa*.



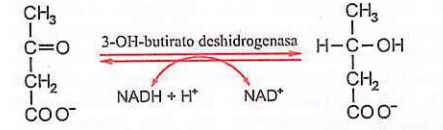
3. **Formación de acetoacetato.** El 3-OH-3-metilglutaril-CoA se escinde en acetoacetato y acetil-CoA, reacción catalizada por *3-OH-3-metilglutaril-CoA liasa*. Esta vía es la principal y en ella se forma la mayor parte del acetoacetato generado en el hígado.

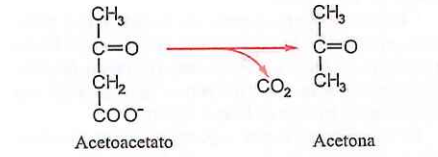


Otra vía de menor importancia es la hidrólisis de acetoacetil-CoA. Este tioéster (reacción 1) puede ser hidrolizado por *acetoacetil-deacilasa*.



El acetoacetato es reducido por *3-hidroxibutirato deshidrogenasa*, enzima ligada a NAD, para formar D-3-hidroxibutirato, otro cuerpo cetónico de importancia. Por descarboxilación, el acetoacetato origina acetona; la producción de este compuesto es de menor cuantía comparada con la de 3-OH-butirato.





Utilización de cuerpos cetónicos

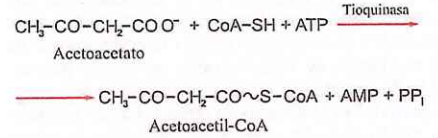
El hígado es el principal órgano de producción de cuerpos cetónicos. Este órgano dispone de todas las enzimas necesarias para la síntesis. Sin embargo, es incapaz de utilizarlos con fines energéticos. Los cuerpos cetónicos pasan desde las mitocondrias de hepatocitos, su lugar de origen, hacia la circulación general, desde donde son captados por los tejidos periféricos.

En condiciones normales, el cerebro no utiliza cuerpos cetónicos; sólo después de ayuno prolongado el sistema nervioso experimenta una adaptación que lo habilita para oxidarlos. El músculo esquelético, corazón y otros tejidos metabolizan cuerpos cetónicos y obtienen de ellos energía. El 3-OH-butirato es oxidado a acetoacetato en reacción catalizada por *3-OH-butirato deshidrogenasa*.

Los tejidos dotados de enzimas capaces de "activar" acetoacetato pueden utilizarlo. Existen dos mecanismos para ello en tejidos extrahepáticos.

a) Transferencia de CoA desde succinil-CoA, reacción catalizada por *succinil-CoA-3-cetoácido-CoA-transferasa*, también llamada *tioforasa*. Es importante en músculo.

b) Reacción catalizada por *tioquinasa* (*acetoacetil tioquinasa*), que requiere ATP.



Para su oxidación final, el acetoacetil-CoA es separado en dos acetil-CoA por acción de *tiolasa* (cataliza la reacción en ambos sentidos).

En personas bien alimentadas el cerebro no posee tioforasa. Cuando la cetonemia es muy alta (2 a 3 mM) se induce la síntesis de la enzima en sistema nervioso central.

Cetosis

En el adulto normal existe equilibrio entre producción y consumo de cuerpos cetónicos; en consecuencia, su concentración en sangre es muy pequeña (1 mg por dL o menor de 0,2 mM). Ocasionalmente se produce un ligero exceso, eliminado por orina. En personas normales, la excreción urinaria de cuerpos cetónicos es siempre inferior a 100 mg por día. En diversas situaciones anormales causantes de aumento exagerado de cetogénesis, se produce el cuadro de cetosis.

Cuando se excede la capacidad de absorción de los túbulos renales se excretan acetoacetato y

3-OH-butirato por orina (*cetonuria*). La acetona se elimina por pulmón con el aire espirado, que adquiere olor característico, fácilmente detectable en pacientes con cetosis.

Para comprender el origen de este cuadro es necesario tener en cuenta algunas interrelaciones metabólicas de ácidos grasos e hidratos de carbono.

La principal vía catabólica de acetatos activos producidos por β-oxidación de ácidos grasos es el ciclo de Krebs, siempre que haya suficiente cantidad de oxaloacetato disponible para formación de citrato en la primera etapa. El oxaloacetato, además de regenerarse en cada vuelta del ciclo, es suministrado principalmente a través de la reacción anaplerótica catalizada por piruvato carboxilasa (págs. 274 y 599). Esto es posible cuando existe buena provisión de piruvato. El más importante proveedor de piruvato es la glucosa, después de las transformaciones de la vía de Embden-Meyerhof o glucólisis. Por esta razón, para que se oxiden en el ciclo de Krebs los acetil-CoA procedentes de ácidos grasos, debe existir un equilibrio entre su catabolismo y el de la glucosa.

Hay situaciones en las cuales este equilibrio se altera, por ejemplo, en la diabetes. En esta enfermedad existe incapacidad para metabolizar glucosa y es necesario obtener energía a partir de la oxidación de ácidos grasos en mayor proporción de lo habitual en sujetos normales. El incremento del catabolismo de ácidos grasos aumenta la producción de acetil-CoA, mientras la oferta de piruvato se reduce, pues no se degrada glucosa. Además, en la diabetes está aumentada la gluconeogénesis, que drena oxaloacetato del ciclo del ácido cítrico. El resultado es disminución de los niveles de oxaloacetato en las células y reducción del flujo de metabolitos a través del ciclo de Krebs. La imposibilidad de oxidar acetatos en el ciclo produce su acumulación y desvío hacia la formación de cuerpos cetónicos. El incremento de acetoacetato y 3-OH-butirato es causa de acidosis metabólica. Estos aniones en exceso se eliminan por orina neutralizados por Na^+ y K^+, lo cual significa pérdida importante de cationes. La cetosis, frecuente en diabéticos no controlados, produce serios desequilibrios en estos pacientes.

En el ayuno prolongado se produce un cuadro semejante al de la diabetes. En ayunas el organismo debe recurrir a sus reservas para atender los requerimientos energéticos de los tejidos. El glucógeno es rápidamente consumido y entonces comienzan a utilizarse grasas de depósito. Aumenta el ritmo de oxidación de ácidos grasos. En estas condiciones de carencia de glúcidos como fuente energética incrementa la actividad gluconeogénica, se sustrae oxaloacetato para sintetizar glucosa y se reduce la actividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Esto, sumado al aumento en la oferta de acetil-CoA, exagera la producción de cuerpos cetónicos.

Formación de glucosa a partir de grasas

Entre los componentes de triacilglicéridos sólo el glicerol es potencialmente glucogénico. Por fosforilación se convierte en glicerol-3-fosfato, el cual se oxida a dihidroxiacetonafosfato. Es ésta una de las triosas fosfato y como tal tiene la posibilidad de seguir el camino de gluconeogénesis hasta glucosa o glucógeno.

Los ácidos grasos no aportan material utilizable para la formación de glucosa. En los animales, el acetil-CoA producido en la β-oxidación no se convierte en oxaloacetato o piruvato, ni en ningún otro compuesto glucogénico. Desde el punto de vista práctico, cada acetato que ingresa al ciclo del ácido cítrico es consumido en el mismo y sus dos carbonos oxidados a CO_2.

Sólo los ácidos grasos con número impar de carbonos originan un producto glucogénico, el propionil-CoA.

BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos se sintetizan a partir de restos acetato (de acetil-CoA), por adición sucesiva de estos fragmentos de dos carbonos al extremo carboxilo de la cadena de acilo en crecimiento. Existe un sistema, localizado en el citosol, responsable de la síntesis de ácidos grasos de hasta 16 carbonos (palmitato). En membranas de retículo endoplásmico liso hay otro sistema enzimático capaz de producir elongación de ácidos grasos ya formados.

Cuando la dieta supera las necesidades calóricas, el exceso de acetil-CoA es derivado hacia la síntesis de acilos y éstos incorporados en triacilgliceroles que contribuyen a incrementar los depósitos de grasas del organismo.

Se considerarán por separado la síntesis citosólica, completa o *de novo*, de ácidos grasos saturados y el proceso de elongación.

Síntesis citoplasmática "de novo"

La síntesis completa de ácidos grasos saturados a partir de acetato activo es catalizada por proteínas multicatalíticas localizadas en hígado,

riñón, cerebro, tejido adiposo, pulmón y glándula mamaria. El principal producto formado es palmitato libre (forma iónica del ácido palmítico).

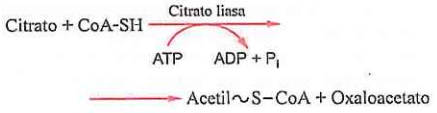
En glándula mamaria el principal ácido graso sintetizado es decanoico o cáprico. Los ácidos grasos en la grasa de la leche son de longitud media (6 a 10 C) lo cual tiene ventajas para su aprovechamiento por el lactante de corta edad, ya que pasan directamente a la sangre sin ser incluidos en quilomicrones y no requieren unión a carnitina para penetrar en mitocondrias.

Los acetil-CoA empleados en la síntesis derivan predominantemente de la descarboxilación oxidativa de piruvato. Efectos regulatorios (ver pág. 388) limitan la disponibilidad de acetatos activos procedentes de la β-oxidación de acilos.

Como los ácidos grasos se sintetizan en el citosol a partir de acetil-CoA y éste se genera principalmente en la matriz mitocondrial, es necesario transferirlo al citoplasma. La membrana interna de las mitocondrias no es permeable a acetil-CoA; por otro lado, el sistema transportador de carnitina funciona preferentemente con acilos de cadena larga. En consecuencia, se requiere otro mecanismo de transferencia.

Lanzadera de citrato. El principal sistema utilizado en mamíferos comprende egreso de citrato de las mitocondrias. El citrato se forma en la primera etapa del ciclo de Krebs por condensación de acetil-CoA y oxaloacetato catalizada por citrato sintasa. Cuando el nivel de ATP en la mitocondria es alto, se acumula citrato porque el ATP inhibe la isocitrato deshidrogenasa y se frena la operación del ciclo de ácidos tricarboxílicos.

El citrato atraviesa la membrana interna gracias al transportador de tricarboxilatos o al contratransportador citrato/malato (sale citrato y entra malato). Una vez en el citosol, el citrato es escindido en reacción catalizada por *citrato liasa*, en la cual participan coenzima A y ATP:



Se regeneran acetil-CoA y oxaloacetato. El resto de dos carbonos es utilizado para la síntesis de ácidos grasos. El oxaloacetato no puede regresar a la mitocondria porque la membrana interna no permite su paso. En cambio, el malato y el piruvato disponen de transportadores.

El oxaloacetato es reducido a malato por la *malato deshidrogenasa* citosólica:

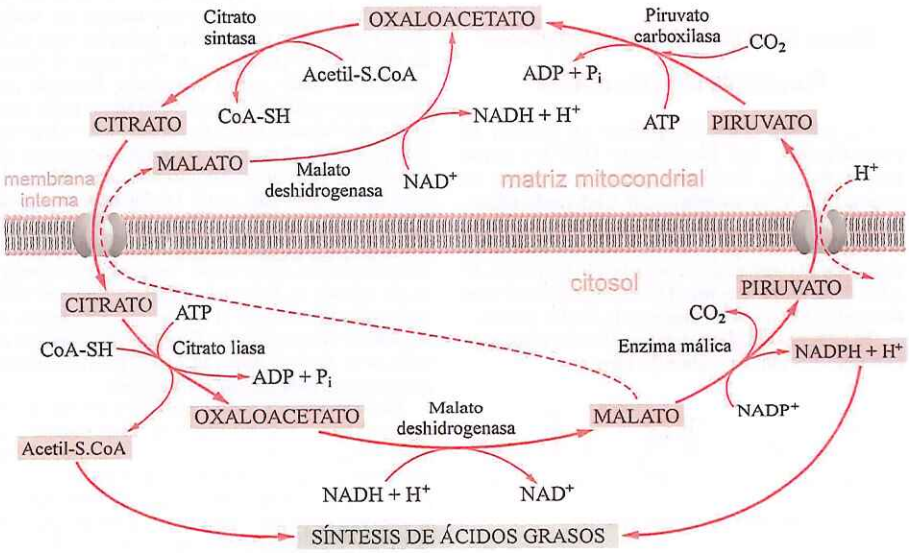
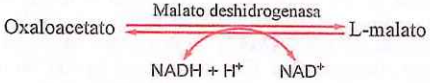
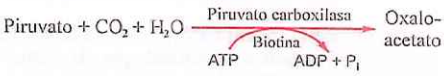


Fig. 15-6. Transferencia de acetilo desde la mitocondria al citosol (papel del citrato).



En una segunda etapa, el malato es descarboxilado a piruvato. La reacción es catalizada por *enzima málica*, ligada a NADP:

Una vez ingresado en la matriz mitocondrial, el piruvato tiene varias alternativas metabólicas. Una de ellas es la carboxilación para formar oxaloacetato. La reacción es catalizada por *piruvato carboxilasa*, enzima que requiere biotina y ATP.



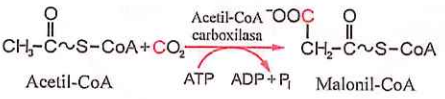
Con esta etapa se cierra un ciclo que transfiere acetilo desde la matriz mitocondrial al citosol. El NADPH generado en la reacción catalizada por la enzima málica contribuye, junto con el NADPH producido en la vía de pentosa fosfato, a suministrar H para síntesis de ácidos grasos. La figura 15-6 resume este proceso.

Etapas de la síntesis de ácidos grasos

Formación de malonil-CoA

La primera etapa comprende un proceso de carboxilación, con bicarbonato (HCO_3^-) como fuente de CO_2. El acetil-CoA es convertido en malonil-CoA. Interviene *acetil-CoA carboxilasa*, con biotina como coenzima. La biotina es una vitamina del complejo B; actúa como transportador de HCO_3^-. La reacción se acopla a la hidrólisis de ATP. Esta etapa irreversible es el principal sitio de regulación de la biosíntesis de ácidos grasos.

El CO_2 se une al extremo metilo del resto acetato para formar un carboxilo libre.



En rojo el C del CO_2 agregado

Parte de la energía liberada por la hidrólisis del ATP es conservada en esa unión C–C y sirve para impulsar la reacción de elongación que sigue.

Ácido graso sintasa

A partir de la formación de malonil-CoA, la síntesis de ácidos grasos de hasta 16 C (palmitato) es catalizada por un sistema multienzimático llamado *ácido graso sintasa*. En animales, el sistema está formado por dos subunidades idénticas que actúan en estrecha asociación. Cada una de las subunidades es una proteína multifuncional; en la misma cadena polipeptídica se encuentran todas las enzimas necesarias para la síntesis y la porción transportadora de acilos. Sin embargo el sistema muestra actividad sólo cuando se forma el homodímero.

Una subunidad tiene una masa aproximada a 270 kDa y está compuesta por tres dominios globulares unidos por segmentos de cadena al azar. El primer dominio, a partir del extremo N-terminal, es el sitio de ingreso y condensación de los sustratos. Contiene tres enzimas: *acetiltransferasa, maloniltransferasa* y *cetoacil sintasa* o *enzima condensante*. Esta última tiene en el sitio activo un resto cisteína cuyo grupo -SH desempeña un papel muy importante. El segundo dominio es la unidad de reducción. Tiene tres sitios catalíticos: *3-cetoacil reductasa, 3-hidroxiacil deshidratasa* y *enoil reductasa*. Además, en este dominio se encuentra la *proteína transportadora de acilos* (PTA) (las siglas del nombre en inglés son ACP, de *acyl carrier protein*). La PTA posee *4'-fosfopanteteína* como grupo prostético, formado por mercaptoetanolamina con su -SH libre, ácido pantoténico (vitamina del complejo B) y un resto fosfato mediante el cual se une a un resto serina de la proteína. Este grupo se encuentra también en la coenzima A (ver pág. 596). La fosfopanteteína de PTA fija acilo mediante enlace tioéster a su grupo SH. Los acilos quedan "anclados" en la PTA y la fosfopanteteína actúa como "brazo móvil" que sirve de soporte al acilo y lo desplaza desde el sitio activo de una enzima al de la siguiente según la secuencia de reacciones. El tercer dominio es el sitio en el cual se libera el ácido graso formado; contiene una *tiolesterasa* o *deacilasa*.

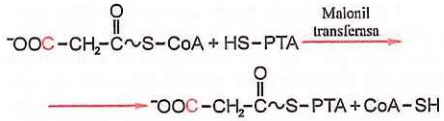
El segmento de cada monómero situado entre los dominios I y II no contiene sitios catalíticos, pero juega un papel importante en la formación del dímero. Las subunidades se conectan en su parte media, ambas forman una X. Inicialmente se propuso que los monómeros estaban orientados antiparalelamente, la cabeza de uno frente a la cola del otro, pero nuevas evidencias indicaron que la orientación es cabeza a cabeza.

El complejo cataliza la adición sucesiva de unidades de 2 C al extremo carboxilo del acilo en crecimiento. Cada adición requiere malonil-CoA y libera dióxido de carbono. Esta descarboxilación provee energía para formar la nueva unión C-C.

La secuencia de reacciones en el sistema es:

1. **Transferencia de acetato.** Una molécula de acetil-CoA llega al sitio de ingreso en el dominio 1 y la *acetil transferasa* une el resto acetilo por unión tioéster a un grupo -SH en el sitio activo de la enzima condensante. Se libera CoA-SH.

2. **Transferencia de malonilo.** El malonil-CoA formado en la reacción catalizada por *acetil-CoA carboxilasa* ingresa por el mismo dominio 1 que recibió el resto acetilo. Por acción de *malonil transferasa* o *malonil-CoA-PTA transacilasa*, el resto malonilo es transferido al -SH de la fosfopanteteína de PTA en el dominio 2 de la subunidad vecina.



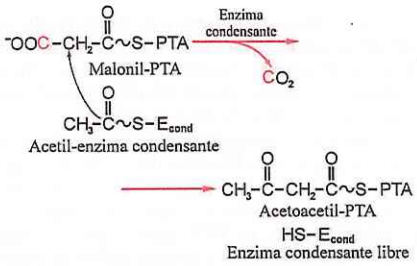
Después de estas etapas preparatorias siguen cuatro reacciones que comprenden sucesivamente condensación, reducción, deshidratación y nueva reducción. En ambas reducciones el NADPH provee hidrógenos.

3. **Condensación de acetilo con malonilo.** El carboxilo libre del grupo malonilo se separa como CO_2. Inmediatamente se une el resto acetilo en la posición que ocupaba el carboxilo perdido. El acetilo se desprende del sitio activo de la enzima condensante, cuyo -SH queda libre. Los dos carbonos del acetato serán los dos últimos C del ácido graso a formarse. El grupo metilo del acetilo será el $-CH_3$ terminal (o Cω) del ácido graso.

El CO_2 liberado por el malonilo es el mismo que ingresó en la reacción inicial de carboxilación. El resultado después de la condensación equivale a la unión de dos restos acetato.

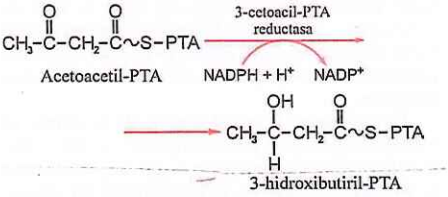
¿Qué sentido tiene la carboxilación de acetil-CoA al comienzo del proceso, si el CO_2 agregado en esa etapa ha de ser eliminado de inmediato? Esta reacción se justifica si se tiene en cuenta la notable disminución de energía libre que se produce en la reacción de descarboxilación del malonilo, que hace posible la condensación de restos acilo.

La unión de acetilo con malonilo descarboxilado para formar acetoacetil-PTA es catalizada por *enzima condensante*

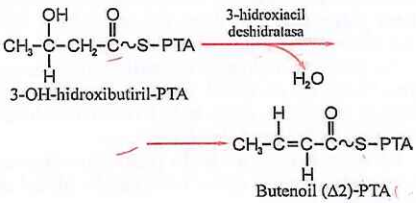


El acetoacetil formado sigue unido al SH de fosfopanteteína, que lo desplaza hacia la próxima enzima.

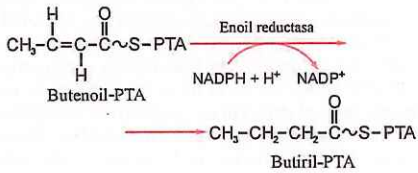
4. **Primera reducción.** Acetoacetil-PTA recibe dos hidrógenos en reacción catalizada por *3-cetoacil reductasa* o *3-cetoacil-PTA reductasa*, en la cual se transfieren hidrógenos de NADP reducido para formar 3-hidroxibutiril-PTA.



5. **Deshidratación.** El 3-hidroxiacil-PTA pierde una molécula de agua en reacción catalizada por 3-hidroxiacil deshidratasa. Se forma un acilo insaturado entre carbonos 2 y 3 (Δ-2-enoil-PTA).



6. **Segunda reducción.** El compuesto no saturado es hidrogenado por acción de la *enoil reductasa*, sexta enzima del complejo, dependiente de NADP reducido como donante de hidrógenos. Se forma butiril-PTA.



A esta altura del proceso se ha formado un resto acilo saturado de cuatro carbonos. El sistema no se detiene en ácidos de cadena tan corta, continúa agregando segmentos de dos carbonos hasta producir acilos de 16 C (palmitato).

La adición de otros dos carbonos al resto acilo se inicia con la transferencia del acilo de 4 carbonos al -SH del resto cisteína de enzima condensante en la subunidad opuesta. El grupo -SH de fosfopanteteína de PTA queda libre y a éste se une otro malonilo. Los grupos malonilo ingresan por el sitio de entrada en el dominio 1 de la subunidad frente a la PTA receptora. La *malonil transferasa* lo transfiere al -SH de fosfopanteteína en la subunidad opuesta. Se inicia un nuevo ciclo de adición de otros dos C a la cadena. El malonilo pierde su grupo carboxilo libre, que se desprende como CO_2 y une el acilo de cuatro carbonos del ciclo anterior; se forma 3-cetocaproil-PTA. El -SH de la cisteína en la enzima condensante vuelve a quedar libre. Se repite la serie de reacciones reducción-deshidratación-reducción hasta obtener un acilo saturado de seis carbonos, caproil-PTA, transferido al -SH de la enzima condensante.

Este proceso de translocación de la cadena en formación desde un sitio de fijación a otro en forma alternativa es semejante al que ocurre durante la síntesis de cadenas polipeptídicas en ribosomas (ver pág. 450).

Otra etapa con un nuevo malonilo agrega otros dos carbonos a la cadena y así sucesivamente hasta obtener un acilo de 16 carbonos. La hidrólisis catalizada por *tiolesterasa* o *deacilasa* libera palmitato, que debe ser activado a acil-CoA antes de proseguir otra vía metabólica.

La glándula mamaria constituye una excepción. Contiene *decanoil deacilasa*, enzima que libera la cadena de acilo de la PTA cuando ha alcanzado una longitud de 10 carbonos.

La síntesis total de ácido palmítico exige recorrer siete veces el ciclo. La ecuación global de esa síntesis es:

$$\text{Acetil-CoA} + 7\,\text{malonil-CoA} + 14\,\text{NADPH} + 14\,H^+ \longrightarrow$$

$$\longrightarrow \underbrace{CH_3\text{-}(CH_2)_{14}\text{-}COO^-}_{\text{Palmitato}} + 7\,CO_2 + 8\,\text{CoA-SH} + 14\,NADP^+ + 6\,H_2O$$

Los 14 pares de hidrógenos necesarios para las etapas de reducción son cedidos por NADPH; esto exige abundante provisión de coenzima reducida. La principal vía metabólica productora de NADP reducido es la de pentosa fosfato, razón por la cual esta vía es muy activa en tejidos que sintetizan ácidos grasos en cantidad, como hígado, glándula mamaria lactante, tejido adiposo. El libre intercambio NADP-NADPH entre las dos vías es facilitado por la localización de ambos sistemas en el citosol. Otra reacción proveedora de NADPH es la catalizada por enzima málica en el sistema de transferencia de acetilos al citosol.

Los ácidos grasos libres no se acumulan normalmente en la célula porque la velocidad de su producción es regulada según los requerimientos de la síntesis de acilgliceroles y fosfolípidos. La acetil-CoA carboxilasa que cataliza la primera etapa es la principal enzima regulatoria de la vía. Los ácidos grasos de cadena larga tienen acción inhibitoria sobre dicha enzima (retroalimentación negativa). Por otra parte, el citrato activa alostéricamente a la acetil-CoA carboxilasa (ver pág. 390).

Elongación de ácidos grasos

El sistema ácido graso sintasa produce principalmente palmitato. Ácidos grasos de cadena más larga (de 18 y más carbonos) se sintetizan a partir del palmítico por adición sucesiva de unidades de dos carbonos. El primer paso obligado es la activación del acilo por la *tioquinasa* para formar palmitoil-CoA. Intervienen dos sistemas; el más importante (sistema microsomal) se encuentra en la faz citosólica de membranas del retículo endoplásmico. El malonil-CoA provee los restos de dos carbonos y el NADPH los hidrógenos necesarios para la síntesis.

Un segundo sistema de elongación, de menor importancia, funciona en mitocondrias. Utiliza acetil-CoA y NADH o NADPH como donantes de equivalentes de reducción.

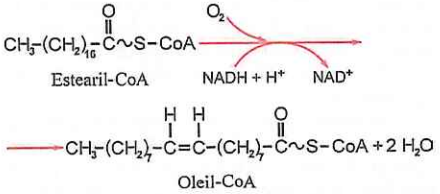
Las etapas de la elongación son similares a las descriptas para la síntesis, pero la cadena no está unida a PTA y las enzimas son controladas por otros genes.

Biosíntesis de ácidos grasos no saturados

Monoetilénicos

Los ácidos grasos monoinsaturados oleico y palmitoleico se sintetizan en el retículo endoplásmico liso a partir de ácido esteárico y palmítico respectivamente. Se parte del acilo activado, al cual se le introduce una doble ligadura entre los carbonos 9 y 10. La reacción es catalizada por un sistema de transporte electrónico formado por la flavoproteína *NADH-citocromo b_5 reductasa*, *citocromo b_5* y *Δ9-desaturasa*. Los electrones son transferidos sucesivamente de NADH al FAD de

la NADH-citocromo b_5 reductasa, de ésta al Fe del citocromo b_5 y luego a un Fe no hemínico (centro Fe-S) de la desaturasa. Finalmente, ésta interactúa con O_2 y acil-CoA saturado. Se forma una doble ligadura entre C 9 y 10 y se liberan dos moléculas de agua. La reacción total puede representarse:



El ácido oleico (18:1Δ9) es el principal producto de la Δ9 desaturasa y el más abundante de los ácidos grasos en los triacilgliceroles de tejido adiposo de mamíferos.

Polietilénicos

Los ácidos poliinsaturados se forman sobre un ácido monoinsaturado producido por el mecanismo descripto. Cuando se ha introducido la primera doble ligadura entre carbonos 9 y 10, los siguientes dobles enlaces se ubican separados por un grupo metileno. Existe sustancial diferencia entre vegetales superiores y animales respecto a la síntesis de ácidos grasos polietilénicos. Los vegetales pueden formar dobles ligaduras adicionales a la primera, ubicada entre carbonos 9 y 10, y el trozo de cadena siguiente (hacia el carbono ω o metilo terminal). En cambio, en mamíferos, la nueva doble unión se introduce en la porción de cadena proximal al grupo carboxilo. Además de la Δ9, en humanos se encuentran Δ6 y Δ5 desaturasas.

La posición ω9 es la más cercana al extremo ω en la cual se puede insertar una doble ligadura. Por ejemplo, a partir de ácido oleico (18:1 Δ9) se obtiene ácido 18:2 Δ6,9 (octadecadienoico). Por esta razón, los ácidos linoleico (18:2 Δ9,12) y linolénico (18:3 Δ9,12,15), ácidos grasos de las series ω6 y ω3 respectivamente, no pueden ser sintetizados por los mamíferos. La incapacidad para introducir dobles ligaduras en posición ω3 u ω6 determina la necesidad de proveer con la dieta esos ácidos grasos, a los cuales se los considera *esenciales* o *indispensables*. Su falta en la alimentación produce efectos carenciales.

El ácido araquidónico (20:4 Δ5,8,11,14) es parcialmente indispensable; los animales pueden sintetizarlo a partir de ácido linoleico, por elongación y desaturaciones adicionales.

Papel fisiológico de ácidos grasos poliinsaturados. Los ácidos grasos esenciales tienen, entre otras, las siguientes funciones: a) Integran lípidos estructurales en las células, principalmente en membranas. Generalmente se encuentran en la posición sn2 de glicerofosfolípidos. b) Son precursores de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. c) Participan en la constitución de ésteres de colesterol en plasma sanguíneo, lo que explicaría su relación con el transporte y nivel de colesterol en plasma.

Ácidos grasos poliinsaturados y aterogénesis. Numerosos estudios han demostrado que el consumo continuado de una proporción adecuada de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta reduce los niveles elevados de LDL y colesterol en plasma, reconocidos como factor de riesgo de aterosclerosis. Por otro lado, la ingesta exagerada de estos ácidos grasos, pasibles de peroxidación, puede predisponer a modificaciones de los lípidos en LDL. La oxidación de LDL es un factor aterogénico.

Algunas observaciones mostraban que los ácidos grasos poliinsaturados ω-3 (n-3), especialmente los contenidos en peces de mar, tendrían mayor efecto que los ω-6 (n-6) en la prevención de la aterogénesis. En efecto, los ácidos eicosapentanoico (EPA, 20:5 n-3), docosahexaenoico (DHA, 20:6 n-3) y linolénico (18:3 n-3) interfieren la agregación de plaquetas y la liberación de citoquinas proinflamatorias comprometidas en el proceso de formación de placas de ateroma. Sin embargo, otras evidencias indican que tanto los ácidos grasos n-3 como los n-6 tienen similares propiedades antiaterogénicas.

Más recientemente se ha mostrado que una dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados (ej.: ácido oleico, 18:1 n-9) es tan efectiva como las que contienen poliinsaturados en reducir el colesterol de LDL y los triacilgliceroles y en aumentar las HDL.

Además de su papel como antiaterogénicos, los ácidos grasos ω-3, especialmente el docosahexaenoico, son importantes componentes de fosfolípidos de membranas del cerebro, indispensables para la función neuronal. La deficiencia de estos ácidos en la dieta produce retardo en el desarrollo del sistema nervioso y alteraciones en la capacidad cognitiva y memoria.

Los isómeros *trans* de ácidos grasos poliinsaturados existentes en pequeña proporción en grasas naturales, aumentan significativamente durante el proceso de hidrogenación de aceites vegetales (elaboración de margarinas). Dietas que contienen cantidades elevadas de estos ácidos grasos *trans* favorecen el incremento de LDL

y colesterol, al igual que las ricas en ácidos grasos saturados y colesterol (grasas animales).

El consumo durante tiempo prolongado de ácidos grasos saturados, particularmente palmítico y de cadena más corta, frecuentemente se acompaña de elevación de LDL. Hasta el presente no se ha definido con claridad el mecanismo por el cual los ácidos grasos saturados ejercen su efecto hipercolesterolémico. Se ha propuesto que tendrían efecto inhibitorio sobre la secreción de ácidos biliares, aumentarían la síntesis de colesterol interfiriendo el control de la enzima regulatoria hidroximetil-glutaril CoA reductasa o deprimiendo la actividad de lecitina-colesterol-acil transferasa (pág. 296) y hasta actuando sobre la expresión génica de factores involucrados en la biosíntesis de colesterol.

Curiosamente, el ácido esteárico, saturado de 18 C, no tendría acción hipercolesterolizante; es neutro en este sentido.

Debe aclararse que el colesterol de los alimentos, si bien un factor de riesgo, que contribuye en alguna medida a agravar el cuadro en personas con hipercolesterolemia, en realidad tiene un efecto menor en los niveles de LDL en plasma, principalmente dependientes de la biosíntesis y metabolismo del colesterol en el organismo.

Por otra parte, más allá del efecto comprobado del contenido y tipo de lípidos de la dieta consumida habitualmente, hay gran variabilidad individual en la respuesta a ingestas elevadas en ácidos grasos saturados o poliinsaturados *trans*. Es evidente que factores genéticos tienen una influencia decisiva en determinar la predisposición a padecer enfermedades cardiovasculares y a establecer la gravitación de los factores de riesgo.

BIOSÍNTESIS DE EICOSANOIDES

Los ácidos grasos poliinsaturados de 20 carbonos (eicosanoicos) son precursores en el organismo de una familia de sustancias llamadas *eicosanoides*, que comprenden compuestos de gran interés funcional: *prostaglandinas*, *tromboxanos* y *leucotrienos*.

Las prostaglandinas son hidroxiácidos insaturados con un anillo ciclopentano. Se las designa con las letras PG seguidas de una tercera (de A a I). Esta tercera letra corresponde a distintos tipos de compuestos que difieren en la posición de funciones hidroxilo y cetona. Las más importantes son las series PGE y PGF; la PGE posee función cetona en el carbono 9 y la PGF, hidroxilo en esa posición. Ambas series tienen hidroxilos en los carbonos 11 y 15. Las siglas correspondientes a cada compuesto se completan con un subíndice indicador del número de dobles ligaduras; PGE_2 y PGF_2 son las más comunes. Finalmente, se agrega otro subíndice para definir la configuración espacial de la cadena unida al carbono 8 del ciclopentano. $PGF_{2\alpha}$ es la prostaglandina con hidroxilos en los C 9, 11 y 15; dos dobles ligaduras entre C 5-6 y 13-14 y las cadenas de los carbonos 8 y 12 del ciclo ubicadas en distinto plano (configuración α).

Los *tromboxanos* tienen estructura parecida, pero poseen un anillo hexagonal en lugar de pentagonal. El más importante es TXA_2. La prostaglandina PGI_2, también llamada *prostaciclina*, es un compuesto con dos ciclos pentagonales (fig. 15-10). $PGF_{2\alpha}$, TXA_2 y PGI_2 son muy inestables en condiciones fisiológicas; rápidamente se convierten en productos inactivos.

Los *leucotrienos* son ácidos grasos con cuatro dobles ligaduras (Δ7,9,11,14).

Las prostaglandinas son sustancias ubicuas; se producen en todas las células a excepción de glóbulos rojos. Los tromboxanos se sintetizan en las plaquetas, la prostaciclina, en endotelio de vasos sanguíneos y los leucotrienos, en leucocitos. En general, actúan cerca del sitio en el cual son sintetizados (acción paracrina); no deben ser transportados por la sangre para actuar en lugares distantes al de su origen.

Prostaglandinas y tromboxanos de la serie 2 (dos dobles ligaduras) y leucotrienos se sintetizan a partir de araquidonato. Comúnmente este ácido graso no se encuentra libre en las células, sino incorporado a fosfolípidos de membrana. Por esta razón, el paso inicial en la síntesis es la hidrólisis de un glicerofosfolípido, como fosfatidilcolina, por acción de fosfolipasa A_2. Se forma lisofosfatidilcolina y se libera el ácido graso en posición 2, frecuentemente araquidonato. El araquidonato puede seguir dos vías: hacia la síntesis de prostaglandinas y tromboxano, o hacia la formación de leucotrienos.

Síntesis de prostaglandinas y tromboxano. Se inicia con la conversión del ácido araquidónico en endoperóxido cíclico (PGG_2) por acción de una *prostaglandina endoperóxido sintasa* de retículo endoplásmico. El PGG_2 es luego transformado en PGH_2 por una peroxidasa. Las dos etapas iniciales (ciclización y peroxidación) son catalizadas por una enzima bifuncional llamada *ciclo-oxigenasa* (COX). Existen dos isozimas de la ciclo-oxigenasa, designadas 1 y 2 (COX-1 y COX-2). COX-1 es una enzima *constitutiva* que se expresa en la mayoría de células. En cambio, COX-2 es *inducible* por citoquinas y factores de crecimiento y su distribución celular es más restringida. Se ha ob-

servado que la actividad ciclo-oxigenasa aumenta notablemente en tejidos afectados por procesos inflamatorios y que el incremento se debe a inducción de la síntesis de COX-2.

A partir de PGH_2 distintas modificaciones químicas llevan a la formación de PGE_2, o $PGF_{2\alpha}$, o de tromboxano TXA_2 y prostaciclina (PGI_2) (fig. 15-7).

Síntesis de leucotrienos. La vía alternativa hacia leucotrienos se inicia por acción de enzimas citosólicas, las *lipo-oxigenasas*, que catalizan la conversión de araquidonato en ácido hidroperoxi-eicosatetraenoico (HPETE). Las lipo-oxigenasas tienen especificidad celular y también por el sitio de la cadena carbonada en el cual insertan el grupo hidroperoxi. Por ejemplo, los leucocitos contienen 5-lipo-oxigenasa y 12-lipo-oxigenasa, que producen 5-HPETE y 12-HPETE respectivamente, mientras las plaquetas tienen sólo 12-lipo-oxigenasa. La 5-lipo-oxigenasa es la más importante, ya que conduce a la síntesis de leucotrienos.

El 5-HPETE es convertido en un epóxido inestable, el leucotrieno A_4 (LTA_4), que se transforma en leucotrieno B_4 (LTB_4) por acción de una hidrolasa. Alternativamente el carbono 6 de A_4 puede unir glutatión (tripéptido γ glutamil-cisteinil-glicina) para formar leucotrieno C_4 (LTC_4).

LTC_4 pierde glutamato por hidrólisis; se obtiene LTD_4 el cual se convierte en LTE_4 por eliminación del resto glicina (fig. 15-8). La mezcla de LTC_4 y LTD_4 es llamada sustancia de reacción lenta de anafilaxia (SRS-A), conocida desde mucho antes del descubrimiento de los leucotrienos; participa en reacciones inmunológicas.

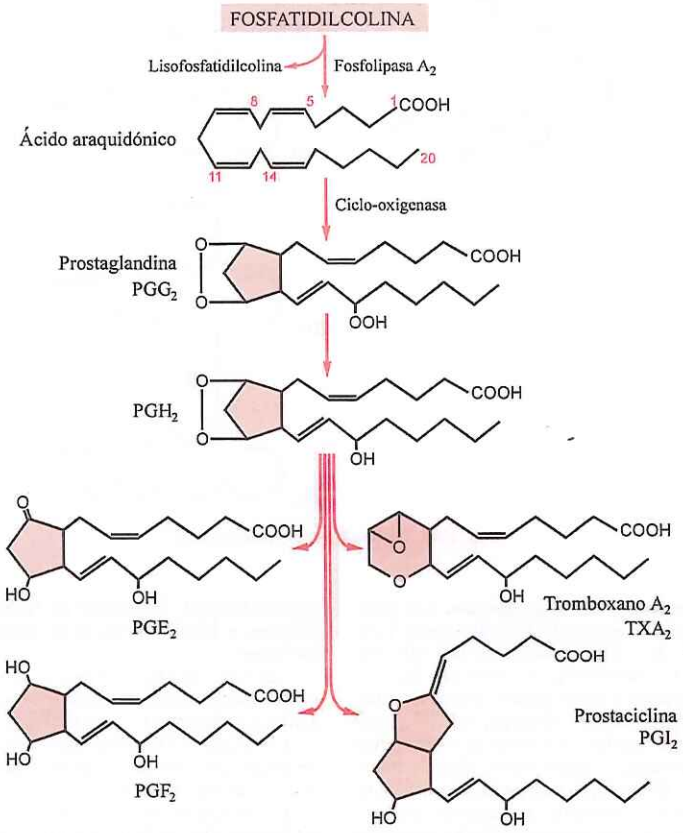


Fig. 15-7. Vía de síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina.

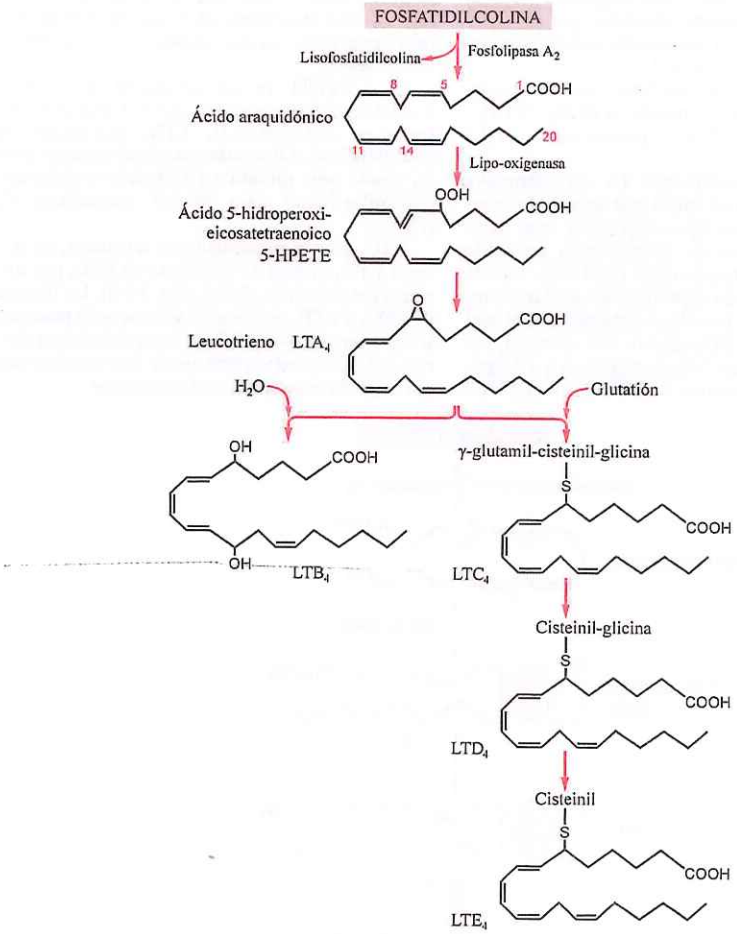


Fig. 15-8. Vía de síntesis de leucotrienos.

Papel funcional de eicosanoides. Las prostaglandinas tienen gran actividad biológica. Concentraciones de 1 ng (nanogramo) por mL producen notable contracción de músculo liso. Su acción es variada; a veces distintas prostaglandinas son antagónicas. Por ejemplo, la $PGF_{2\alpha}$ tiene potente acción constrictora sobre la musculatura lisa de bronquiolos y vasos mesentéricos, mientras PGE_2 es dilatadora de bronquios y vasos de corazón, riñón, mesenterio y músculo esquelético. En general, las prostaglandinas provocan contracción de músculo liso en útero y tracto gastrointestinal, inhibición de lipólisis en tejido adiposo, e inhibición de la secreción de HCl en estómago.

Los tromboxanos son agregantes de plaquetas y vasoconstrictores; la prostaciclina es antiagregante de plaquetas y vasodilatadora.

Las PGE_2 y PGI_2 (prostaciclina) aumentan la permeabilidad capilar y contribuyen a la fase vascular de la inflamación, con producción de edema.

Los leucotrienos son poderosos constrictores de la musculatura lisa de bronquios; en esta acción han demostrado ser 1.000 veces más poten-

tes que la histamina. Producen vasoconstricción en arteriolas pequeñas y aumentan la permeabilidad capilar en mayor grado que la histamina. A través de esta acción contribuyen al edema que acompaña a las inflamaciones. Los leucotrienos, como las prostaglandinas, son mediadores en procesos inflamatorios. También están relacionados con respuestas inmunológicas anormales, como la alergia. De allí el gran interés despertado por el hallazgo de estos compuestos.

La aspirina, indometacina y otros compuestos utilizados como antiinflamatorios (antiinflamatorios no esteroideos, AINE) bloquean la síntesis de prostaglandinas por su acción inhibitoria sobre ambas ciclo-oxigenasas. Esos fármacos, además de su acción antiinflamatoria tienen efectos colaterales indeseables, entre ellos el favorecer la producción de ulceraciones o hemorragias gastroduodenales.

Se han diseñado fármacos que inhiben selectivamente a la COX-2, enzima más relacionada con la producción de prostaglandinas en sitios de inflamación. Estos agentes tienen acción antiinflamatoria sin los efectos colaterales de los inhibidores de COX-1.

Otros inhiben la fosfolipasa A_2, disminuyen la liberación de araquidonato y reducen la actividad de síntesis de eicosanoides. Se han descripto también compuestos que pueden inhibir algunas de las etapas de síntesis de leucotrienos.

La posibilidad de interferir farmacológicamente la producción de estas sustancias tiene gran interés médico.

BIOSÍNTESIS DE TRIACILGLICEROLES

La síntesis de triacilgliceroles exige activación previa de glicerol y ácidos grasos a glicerol-3-fosfato y acil-CoA respectivamente. En ambos casos, el proceso requiere ATP y la quinasa correspondiente.

En hígado, intestino, glándula mamaria y riñón, la *gliceroquinasa* cataliza la activación del glicerol. En cambio, en tejidos muscular y adiposo, la enzima está ausente y el glicerol-3-fosfato es, en individuos con alimentación normal, derivado de dihidroxiacetonafosfato, metabolito intermediario de la glucólisis.

El glicerofosfato puede también generarse en hígado y tejido adiposo, principalmente en condiciones de ayuno, por *gliceroneogénesis*. Esta se inicia con formación de fosfoenolpiruvato a partir de oxaloacetato (reacción catalizada por fosfoenolpiruvato carboxiquinasa) y continúa con las etapas de la gluconeogénesis (ver fig. 14-11) hasta triosas fosfato. La dihidroxiacetona fosfato se convierte en glicerol-3-fosfato por acción de la glicerofosfato deshidrogenasa.

Los ácidos grasos son activados a acil-CoA por acción de *tioquinasa*, que utiliza ATP y CoA.

El glicerol-3-fosfato es esterificado en los hidroxilos de carbonos 1 y 2 por dos acilos transferidos desde acil-CoA, para formar 1,2-diacilglicerolfosfato, también llamado *ácido fosfatídico*. La reacción es catalizada por *glicerofosfato aciltransferasa*.

$$\text{Glicerol-3-fosfato} + 2\ \text{Acil-CoA} \xrightarrow[\text{transferasa}]{\text{Acil}} \underset{\text{fosfatídico}}{\text{Ácido}} + 2\ \text{CoA-SH}$$

El ácido fosfatídico sufre hidrólisis catalizada por una fosfatasa (*ácido fosfatídico fosfohidrolasa*) y es convertido en 1,2-diacilglicerol.

$$\text{Ácido fosfatídico} \xrightarrow{\text{Fosfatasa}} \text{1,2 diacilglicerol} + P_i$$

Una nueva molécula de acil-CoA transfiere otro acilo al diacilglicerol en enlace éster y se forma triacilglicerol. Esta última reacción es catalizada por *diacilglicerol aciltransferasa*.

Las enzimas involucradas en la síntesis de triacilgliceroles se encuentran en la fracción microsomal de las células (retículo endoplásmico liso).

En la mucosa intestinal, los monoacilgliceroles absorbidos adicionan restos acilos de acil-CoA hasta completar triacilgliceroles sin necesidad de activación previa a ácido fosfatídico.

Obesidad

El tejido adiposo es el principal sitio de almacenamiento de grasas del organismo; la magnitud de este depósito depende del número total de adipocitos existentes y de la cantidad de triacilgliceroles por célula. Ambos aumentan en la *obesidad*, condición frecuente en humanos, que constituye un problema de salud cada vez más serio en muchos países. Se calcula que actualmente en el mundo hay más de mil millones de personas obesas de diversa gravedad.

Existe un desequilibrio del balance energético, con mayor ingreso que consumo de energía.

Las grasas en exceso saturan la capacidad de almacenarlas del tejido adiposo y empiezan a depositarse en otros órganos, como hígado, músculo, corazón, etc., con el consiguiente deterioro funcional.

La sobrecarga de grasas influye sobre los niveles de lipoproteínas. Por ejemplo, el mayor flujo de ácidos grasos desde tejido adiposo a hígado estimula la producción de VLDL, disminuye la lipólisis de lipoproteínas ricas en triacilglicéridos mediada por la lipoproteína lipasa y aumenta el catabolismo de HDL.

Generalmente se suma insensibilidad de los tejidos a la insulina que puede resultar en hiperglucemia.

A esta patología contribuyen múltiples factores (genéticos, neurológicos, psíquicos, hormonales, ambientales). En muchos casos, la alteración reside principalmente en los mecanismos que regulan el apetito.

La sensación de hambre es monitoreada por un complejo sistema de hormonas y péptidos secretados en el hipotálamo, que influyen la conducta de ingesta de alimentos. Los más importantes de estos factores son la *hormona melanocito estimulante* α (MSHα), de acción anorexígena o depresora del apetito y el *neuropéptido Y* y la *proteína relacionada con agouti*, de efecto estimulante u orexígeno. La liberación de estos factores es modulada por agentes generados en el tracto digestivo y en el tejido adiposo.

En el estómago se produce *grelina* (*ghrelin*), activador de las neuronas que liberan neuropéptido Y. Su secreción se eleva en los períodos entre comidas, cuando la cavidad gástrica está vacía; al llegar alimentos al estómago, la producción cae rápidamente. Un antagonista de la grelina es la *colecistoquinina* de intestino. Su secreción aumenta inmediatamente después de una comida. También como supresora del apetito actúa otra hormona del intestino, llamada PYY, de efecto más prolongado, hasta 12 horas después de la ingesta de alimentos.

El tejido adiposo no es sólo un depósito de grasas, sino un activo órgano endocrino; juega un papel importante en la regulación del balance energético y la homeostasis nutricional. Produce hormonas proteínicas como leptina, adiponectina, resistina y citoquinas proinflamatorias.

La *leptina* es una proteína de 16 kDa secretada por los adipocitos; sus niveles plasmáticos, en humanos, se incrementan después de unos 3 o 4 días de excesos en la ingestión de alimentos y disminuyen a las varias horas de ayuno.

La leptina liberada en la circulación atraviesa la barrera hematoencefálica, se une a receptores específicos en neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo y desencadena una serie de acciones: inhibe la producción de neuropéptidos orexígenos, activa la de anorexígenos y estimula el catabolismo. Tiene efectos importantes sobre el balance energético. Como resultado, disminuye la ingesta de alimentos, se reduce el peso corporal, aumenta la oxidación de grasas y el gasto de energía. La ausencia de leptina, o su incapacidad para llegar al cerebro o para interactuar con sus receptores, llevan a la obesidad. En una cepa de ratones obesos se demostró falta de leptina por defectos en el gen que la codifica. En obesos humanos no se ha detectado carencia de leptina, sino aumento de sus niveles en plasma. Hay falta de respuesta a la misma, quizás por fallas en los receptores. Las pruebas clínicas indican que la administración de leptina no tiene efecto sobre el peso corporal de obesos. La leptina y otras hormonas del tejido adiposo tienen importante acción en la regulación del metabolismo energético y en mejorar la sensibilidad de los tejidos a la insulina (ver pág. 546).

La *insulina*, hormona de los islotes de Langerhans en el páncreas, entre sus múltiples acciones, también contribuye a mantener la sensación de saciedad y reducir la tendencia a ingerir alimentos, ya sea directamente, suprimiendo la liberación de neuropéptido Y en hipotálamo, o indirectamente estimulando la adipogénesis a partir de glucosa.

La leptina y la insulina ejercen sus efectos más a largo plazo que los otros factores mencionados.

BIOSÍNTESIS DE FOSFOLÍPIDOS

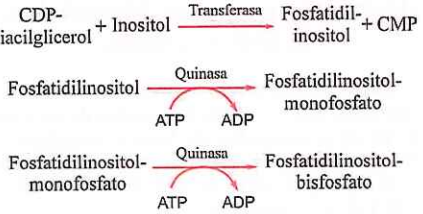
Los fosfolípidos más abundantes en animales superiores se forman a partir de ácido fosfatídico, cuya síntesis se ha considerado en la sección anterior. Este compuesto es un importante intermediario metabólico, pues de él se originan tanto triacilgliceroles como glicerofosfolípidos. Las enzimas involucradas en la síntesis de fosfolípidos se encuentran insertas en membranas del retículo endoplásmico.

El ácido fosfatídico reacciona con el nucleósido trifosforado citidina trifosfato (CTP) para formar citidina difosfato diacilglicerol (CDP-diacilglicerol), forma activada de ácido fosfatídico. La reacción es catalizada por *CDP-ácido fosfatídico-citidiltransferasa*.

$$\text{Acido fosfatídico} + \text{CTP} \xrightarrow{\text{Transferasa}} \text{CDP-diacilglicerol} + \text{PP}_i$$

Biosíntesis de fosfatidilinositol y fosfatidilserina. Otra transferasa específica (*CDP-diacilglicerol-inositoltransferasa*) cataliza la formación de fosfatidilinositol. Este compuesto es fosforilado para obtener polifosfoinositoles. Por acción de

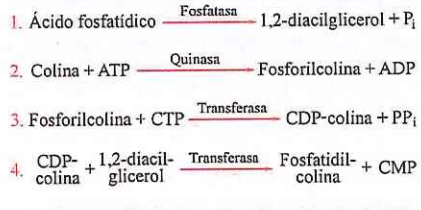
quinasas que transfieren fosfato de ATP, se forman sucesivamente fosfatidilinositolmonofosfato y fosfatidilinositolbisfosfato. Este último compuesto tiene gran interés (ver pág. 496); en respuesta a hormonas o intermediarios químicos, el fosfatidilinositolbisfosfato se hidroliza liberando inositoltrisfosfato, que actúa como "segundo mensajero".



La fosfatidilserina es un componente de menor importancia en las membranas celulares en animales superiores. Se forma también por transferencia de serina al intermediario activado CDP-diacilglicerol.

Biosíntesis de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. Fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina son los fosfolípidos más abundantes de membranas celulares en animales superiores. Para su síntesis se requiere ácido fosfatídico, que es hidrolizado a 1,2-diacilglicerol y fosfato. Las bases colina y etanolamina reaccionan con ATP para formar fosforilcolina y fosforiletanolamina. Posteriormente, estos compuestos se combinan con citidina trifosfato (CTP) y dan citidina difosfato colina (CDP-colina) y citidinadifosfato etanolamina (CDP-etanolamina). La primera reacción es catalizada por *quinasas* y la segunda por *transferasas* específicas. Los nucleótidos de citidina son intermediarios de alta energía que participan en la síntesis de estos lípidos. Finalmente, CDP-colina o CDP-etanolamina reaccionan con 1,2-diacilglicerol para formar fosfatidilcolina o fosfatidiletanolamina respectivamente.

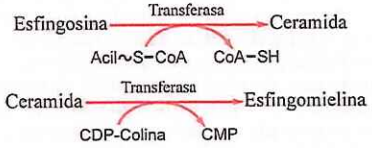
La serie de reacciones es la siguiente:



La incapacidad para sintetizar dipalmitoilfosfatidilcolina, importante componente del "surfactante" en alvéolos pulmonares (pág. 106), es causa del síndrome de "distrés respiratorio", frecuente en niños prematuros.

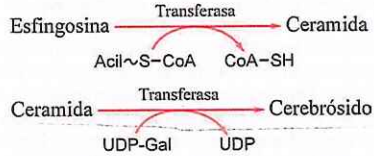
Biosíntesis de esfingomielina. La esfingomielina está constituida por ceramida unida a fosforilcolina. La ceramida resulta de la unión, por enlace amida, del aminoalcohol esfingosina o esfingol con un ácido graso de cadena larga.

La esfingosina es biosintetizada a partir de serina y palmitoil-CoA. Luego se transfiere un acilo de acil-CoA al N de la esfingosina para formar ceramida. Finalmente otra transferasa inserta un resto fosforilcolina de CDP-colina, en unión éster con el hidroxilo del carbono primario de ceramida.



La síntesis de estos compuestos tiene lugar en el retículo endoplásmico liso.

Biosíntesis de cerebrósidos y gangliósidos. Los cerebrósidos son glicolípidos constituidos por ceramida (esfingosina + ácido graso) unida a un resto glicosídico (galactosa o glucosa). Para la síntesis de cerebrósidos (los más abundantes son galactosilcerebrósidos) se transfiere el resto galactosil de UDP-galactosa al hidroxilo primario de ceramida.



Los gangliósidos poseen una cadena oligosacarídica unida al carbono 1 del esfingol de la ceramida. Las unidades monosacarídicas se transfieren desde su forma activada de nucleótido-azúcares (UDP-Gal, UDP-Glc, UDP-GalNAc, UDPGlcNAc, GDP-fucosa). El ácido siálico activo es el CMP-NeuAc (citidina-monofosfato-ácido-N-acetil-neuramínico).

En la síntesis de sulfolípidos (sulfátidos) es necesario transferir restos sulfato y en este caso la forma activa es el fosfoadenosinafosfosulfato (PAPS).

El ensamble de las cadenas oligosacarídicas tiene lugar principalmente en el complejo de Golgi.

Alteraciones de la biosíntesis de ácidos grasos, fosfolípidos y esfingolípidos. Se han descripto al menos 14 diferentes cuadros clínicos relacionados con defectos en la síntesis de ácidos grasos de cadena larga, fosfolípidos y esfingolípidos. La sintomatología principal de estos trastornos puede agruparse en tres categorías: a) de sistema nervioso central, con leucodistrofia en algunos casos, b) neuropatía periférica y c) alteraciones de músculo y corazón eventualmente con mioglobinuria.

Degradación de lípidos complejos

Los lípidos complejos de membranas celulares están en permanente recambio. La degradación es catalizada por enzimas específicas. Los glicerofosfolípidos, por ejemplo, requieren varias enzimas para su total degradación. *Fosfolipasa A_2* cataliza la hidrólisis de la unión éster del ácido graso en posición 2, con lo cual se forman un lisofosfolípido y un ácido graso libre, generalmente insaturado. El ácido graso en la posición 1 del lisofosfolípido es liberado por hidrólisis catalizada por *fosfolipasa B* (lisofosfolipasa). Posteriormente una hidrolasa separa la base (colina, etanol-amina) y deja glicerol-3-fosfato (fig. 15-9).

Otras enzimas actúan sobre el fosfolípido entero; *fosfolipasa A_1* cataliza la hidrólisis de la unión éster del ácido graso en posición 1. *Fosfolipasa C* actúa sobre la unión éster del fosfato en posición 3 y *fosfolipasa D* sobre la unión del fosfato a la base.

En los jugos digestivos se encuentran fosfolipasas que participan en la degradación de los fosfolípidos de alimentos. Otras fosfolipasas intracelulares intervienen en cascadas enzimáticas productoras de sustancias con gran actividad fisiológica, algunas de ellas "mensajeros" en sistemas de señales. Por ejemplo, la *fosfolipasa A_2* libera araquidonato, precursor de prostaglandinas y leucotrienos, y *fosfolipasa C* participa en la cascada de fosfoinositósidos (ver pág. 496).

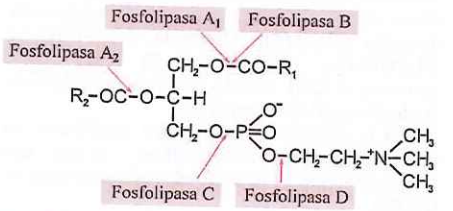


Fig. 15-9. Sitios de acción de fosfolipasas sobre un glicerofosfolípido.

Otros fosfolípidos complejos son degradados por enzimas lisosomales específicas para cada tipo de enlace: esfingomielinasa, α-fucosidasa, hexosaminidasas, galactocerebrosidasa, sulfatidasa, ceramidasa, etc.

Alteraciones congénitas del catabolismo de lípidos complejos

Existe un grupo de enfermedades hereditarias caracterizadas por trastornos metabólicos resultantes en acumulación de lípidos complejos en diversos tejidos. En general, se manifiestan desde la niñez y afectan seriamente el desarrollo y sobrevida del individuo.

Entre estos "errores congénitos de metabolismo" de causa genética se ha descripto una variedad de enfermedades rotuladas genéricamente como *esfingolipidosis*. En todas ellas hay alteraciones en la síntesis de enzimas involucradas en la degradación de esfingolípidos (esfingomielina, cerebrósidos, gangliósidos, sulfátidos). Por el carácter de este texto, no es posible detallar todos los cuadros de este tipo conocidos hasta el presente; sólo citaremos unos pocos a modo de ejemplo.

Enfermedad de Niemann-Pick. Los pacientes presentan notable aumento del tamaño de hígado y bazo (hepatoesplenomegalia). Las células de hígado y bazo tienen aspecto moteado (células espumosas). Se acumula gran cantidad de esfingomielina en los tejidos. El defecto primario es falta de *esfingomielinasa*, enzima que cataliza el primer paso catabólico de la esfingomielina, separando por hidrólisis ceramida y fosforilcolina.

Enfermedad de Gaucher. Los individuos afectados presentan hepatoesplenomegalia y células características, cargadas de lípidos, en distintos tejidos y en médula ósea. En el tipo más frecuente de esta enfermedad no hay compromiso de sistema nervioso. Se acumulan en las células glucocerebrósidos, no degradados por falta de la *glucocerebrosidasa*.

Enfermedad de Tay-Sachs. Las células nerviosas, particularmente en corteza cerebral, se muestran repletas de lípidos, en su mayor parte un ganglíósido normalmente muy escaso (G_{M2}). El defecto bioquímico es falta de *hexosaminidasa A* que cataliza la hidrólisis de la unidad acetilgalactosamina en el ganglíósido G_{M2} [Ceramida-Glc-Gal(NeuAc)-GalNAc]. La acumulación de este compuesto produce graves alteraciones, retraso mental, ceguera, debilidad muscular.

Enfermedad de Sandhoff. El defecto genético produce ausencia de hexosaminidasas A y B.

Tabla 15-4. Esfingolipidosis.

Enfermedad	*Enzima deficiente*	*Sustancia acumulada*	*Síntomas*
Niemann-Pick	Esfingomielinasa	Esfingomielina	Hepatoesplenomegalia, retardo mental, células espumosas en médula ósea.
Gaucher	β-glucocerebrosidasa	Glucocerebrósido	Hepatoesplenomegalia, erosión de huesos largos y pelvis.
Tay-Sachs	Hexosaminidasa A	Ganglióside G_{M_2}	Retardo mental, ceguera, muerte temprana.
Sandhoff	Hexosaminidasa A y B	Ganglióside G_{M_2}	Retardo mental, ceguera, muerte temprana.
Fabry	α-galactosidasa A	Trihexósido de ceramida	Ligada a cromosoma X. Dolores en extremidades inferiores, lesiones de piel, enfermedad renal.
Krabbe	Galactocerebrosidasa	Galactocerebrósido	Retardo mental, desmielinización, muerte temprana.
Farber	Ceramidasa	Ceramida	Retardo mental, alteraciones esqueléticas, dermatitis, muerte temprana.
Leucodistrofia metacromática	Arilsulfatasa	Sulfátido	Retardo mental, desmielinización, parálisis, progresiva.
Gangliosidosis generalizada	β-galactosidasa	Ganglióside G_{M_1}	Retardo mental, hepatomegalia, alteraciones esqueléticas.
Fucosidosis	α-fucosidasa	Cer-Glc-Gal-GalNAc-Gal-Fuc	Lesiones degenerativas en cerebro, espasticidad muscular, engrosamiento de piel.

Se acumulan ganglióside G_{M2} y globósidos. Determina serias anomalías neurológicas.

Los cuadros mencionados, y otros en los cuales está afectada la degradación de proteoglicanos, han sido también designados *enfermedades lisosomales*. Las hidrolasas comprometidas en el catabolismo de estos compuestos se encuentran en lisosomas y las etapas de degradación se cumplen en dichas organelas. La tabla 15-4 presenta algunos de estos cuadros.

Si bien estas enfermedades no son frecuentes, el médico general debe conocer su existencia para diagnosticarlas, o por lo menos sospecharlas, cuando se presentan. Ello le permitirá realizar la correcta derivación a un centro especializado.

METABOLISMO DE COLESTEROL

La dieta habitual provee unos 300 mg de colesterol por día. Esta sustancia es absorbida en intestino al estado libre y es esterificada dentro de células de la mucosa, principalmente con ácido oleico, en reacción catalizada por *acil-CoA-colesterol-aciltransferasa* (ACAT). Los ésteres de colesterol son incorporados, junto con triacilgliceroles, en los quilomicrones enviados a la sangre, donde son sometidos a la acción de la *lipoproteína lipasa*. Las partículas residuales o remanentes, con colesterol esterificado, son captadas por el hígado para su degradación final.

El organismo no depende del aporte exógeno para sus necesidades de colesterol; casi todos los tejidos tienen capacidad para sintetizarlo. Un adulto normal produce alrededor de 1 g por día; de este total corresponde al hígado algo menos de la mitad; el resto, principalmente a intestino, gónadas, glándula suprarrenal, piel, músculo y tejido adiposo.

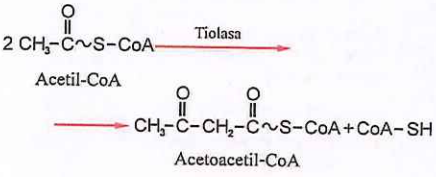
BIOSÍNTESIS DE COLESTEROL

La biosíntesis de colesterol se realiza a través de una serie de etapas, cuyo conocimiento detallado fue posible gracias a los trabajos de Bloch y otros investigadores. Los primeros hallazgos indicaban que todos los carbonos del colesterol provienen de restos acetato. En efecto, cuando se administraba a animales de laboratorio acetatos marcados con ^{14}C, éste aparecía incorporado en la molécula de colesterol.

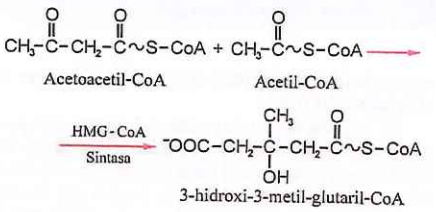
Posteriormente se identificó al *ácido mevalónico* (mevalonato) como intermediario importante en la vía de síntesis. Por pérdida del carboxilo, el ácido mevalónico origina unidades isoprenoides de 5 carbonos, que por sucesivas condensaciones forman *escualeno*, hidrocarburo terpénico de 30 átomos de carbono. Por ciclización y otros cambios, este compuesto dará

lugar a colesterol. Se consideran tres fases en el proceso de biosíntesis de colesterol: 1) acetato a mevalonato, 2) mevalonato a escualeno y 3) escualeno a colesterol.

1. **Conversión de acetatos en mevalonato.** Se realiza en tres etapas. En la primera, catalizada por *tiolasa*, dos acetil-CoA forman acetoacetil-CoA. Se libera una molécula de CoA:

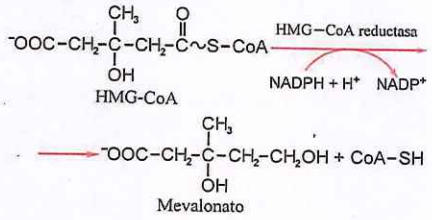


A continuación, el acetoacetil-CoA reacciona con otra molécula de acetil-CoA y se produce 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMGCoA). La enzima responsable es *3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA sintasa* (HMG-CoA sintasa):



El 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA es una encrucijada metabólica; es intermediario en la biosíntesis de colesterol y en la de cuerpos cetónicos. En ambas vías la síntesis de HMG-CoA se realiza por reacciones iguales, pero las enzimas participantes no son las mismas. La que interviene en la síntesis de colesterol está localizada en el citoplasma y la que forma cuerpos cetónicos, en mitocondrias.

En la vía de síntesis de colesterol, uno de los carboxilos del HMG-CoA sufre reducción a alcohol, se libera CoA y se forma mevalonato, compuesto de seis carbonos:



Esta reacción es catalizada por la *hidroximetilglutaril-CoA reductasa;* ligada a NADP reducido como donante de hidrógenos. La enzima es regulable; su actividad se inhibe en presencia de colesterol exógeno y de ácidos biliares.

2. **Conversión de mevalonalo en escualeno.** El mevalonato recibe un fosforilo de ATP y da 5-fosfomevalonato; este compuesto recibe otro

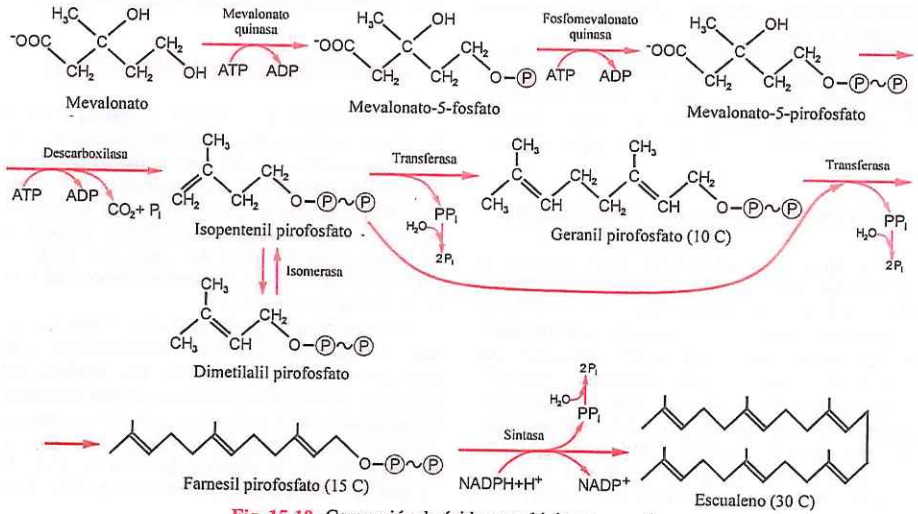


Fig. 15-10. Conversión de ácido mevalónico en escualeno.

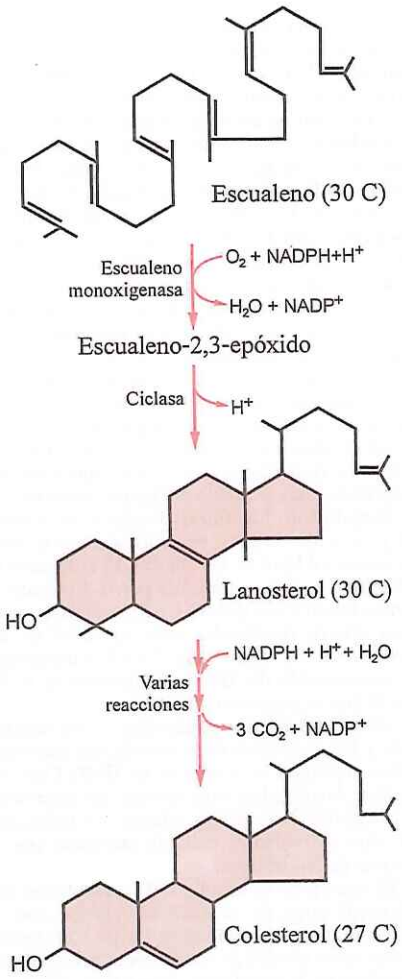


Fig. 15-11. Conversión de escualeno en colesterol.

fosfato para formar mevalonato-5-pirofosfato. Tras una tercera fosforilación se forma un compuesto inestable (no representado en la secuencia de la figura 15-11) el cual se descarboxila, pierde agua y origina *isopentenil pirofosfato*.

Las tres moléculas de ATP necesarias para la síntesis de una de colesterol son utilizadas en las etapas que van de mevalonato a isopentenil pirofosfato. Este último compuesto es transformado por una isomerasa en *dimetilalil pirofosfato* con la doble ligadura en distinta posición.

Isopentenil pirofosfato y dimetilalil pirofosfato se condensan para formar *geranil pirofosfato*, de 10 carbonos. El geranil pirofosfato reacciona con otra molécula de isopentenil pirofosfato y origina un producto de 15 carbonos, *farnesil pirofosfato*. En cada una de las reacciones de condensación de isoprenoides se libera pirofosfato, que es inmediatamente hidrolizado. La energía generada es utilizada para la formación de los enlaces C–C entre los distintos intermediarios.

La unión de dos moléculas de farnesil pirofosfato forma *escualeno*. En esta reacción la coenzima NADPH actúa como donante de hidrógenos. De nuevo, la hidrólisis del pirofosfato liberado en las reacciones de condensación genera la energía que permite la formación de los enlaces C–C.

Las etapas de esta segunda fase en la vía de síntesis de colesterol están representadas en la figura 15-10.

Los isoprenoides activados se utilizan no sólo en la biosíntesis de colesterol, sino también de otros compuestos de importancia, entre ellos coenzima Q, carotenoides, dolicol, vitaminas liposolubles y grupos isoprenilos para el anclaje de proteínas a membranas.

3. **Conversión de escualeno en colesterol.** La estructura del escualeno tiene semejanza con la del núcleo de esteroides (fig. 15-11). Un proceso de ciclización que comprende el cierre de cuatro anillos, desplazamiento de grupos metilo y saturación de dobles ligaduras, forma *lanosterol*, con 30 átomos de carbono y dos dobles ligaduras.

Después de la pérdida de tres grupos metilo que se desprenden como CO_2, de saturación del doble enlace en la cadena lateral y desplazamiento del otro doble enlace a la posición 5-6, el lanosterol se convierte en *colesterol*.

Todas las enzimas que catalizan las etapas de síntesis de colesterol a partir de escualeno se encuentran insertas en membranas del retículo endoplásmico liso y los productos intermediarios permanecen unidos a una proteína transportadora de esterol.

En la figura 15-11 se muestran escualeno, lanosterol y colesterol. Se omiten otros metabolitos intermedios de esta fase final de la biosíntesis de colesterol.

Colesterol plasmático. El colesterol que llega a la sangre circula unido a diferentes lipoproteínas, pero la mayor parte está asociada a LDL (lipoproteína de baja densidad). Del total de colesterol circulante, las dos terceras partes se encuentran esterificadas. La esterificación es catalizada por *lecitina-colesterol-aciltransferasa* (LCAT), que transfiere un resto acilo insaturado (comúnmente linoleato) desde la posición 2 de fosfatidilcolina

(lecitina) al hidroxilo 3 del colesterol. Esta reacción se cumple principalmente en lipoproteínas de alta densidad (HDL), que reciben colesterol libre de tejidos extrahepáticos. Una vez esterificado, el colesterol es transferido, en intercambio por triacilgliceroles, principalmente a VLDL y quilomicrones. La proteína de transporte de colesterol esterificado (CETP) está involucrada en este intercambio (transporte invertido de colesterol).

Las LDL son cuantitativamente las principales transportadoras de colesterol; por esto existe correlación directa entre niveles de colesterol total en sangre y de LDL. La colesterolemia se mantiene dentro de los límites normales por constante remoción en todos los tejidos. Para ello, las células disponen de receptores específicos (receptores LDL) que captan LDL circulantes y las internan por endocitosis. Los ésteres de colesterol son degradados en lisosomas y los productos liberados en el citosol. El nivel de colesterol intracelular ejerce acción reguladora: a) El aumento de colesterol en la célula inhibe la HMG-CoA reductasa, con lo cual se deprime la síntesis. Al bloquearse la vía que genera colesterol endógeno, la célula sólo dispondrá del incorporado con sus receptores LDL. b) El colesterol en exceso, no incorporado en membranas o utilizado en síntesis, es almacenado en la célula como ésteres de colesterol (la esterificación es catalizada por *acil-CoA-colesterol-aciltransferasa*, ACAT, activada por altos niveles de colesterol libre). c) La acumulación de colesterol inhibe la síntesis de receptores LDL. De esta manera, las células ajustan la cantidad de receptores a sus necesidades.

Papel del hígado en el metabolismo del colesterol. El colesterol contenido en el hígado procede de: a) el aporte dietario incorporado en el intestino en los quilomicrones y captado por las células hepáticas con los remanentes de esas partículas; b) los tejidos extrahepáticos que lo ceden a las HDL, en donde la LCAT lo esterifica y luego es transferido a VLDL y quilomicrones. Los remanentes de estas partículas son finalmente internados en los hepatocitos, y c) síntesis en el propio hígado a partir de acetil-CoA derivado principalmente de carbohidratos de la dieta.

Catabolismo y excreción de colesterol. Nuestro organismo no dispone de enzimas para degradar el ciclopentanoperhidrofenantreno, de modo que éste es excretado intacto.

El hígado es el órgano de eliminación de colesterol. Buena parte es transformado en ácidos biliares, de los cuales se producen de 300 a 500 mg por día. La producción de los distintos ácidos biliares requiere la participación de 17 enzimas. Las vías de síntesis comprenden: a) hidroxilación 7α de los esteroides precursores, b) modificación de la estructura de los anillos, c) acortamiento y oxidación de la cadena lateral y d) conjugación del ácido biliar con aminoácidos (ver pág. 236).

Con la bilis se excretan hacia el intestino no sólo ácidos biliares, sino también colesterol. En el intestino estos compuestos son en parte reabsorbidos y vuelven al hígado para cerrar el llamado *ciclo enterohepático*. El colesterol y los ácidos biliares no absorbidos sufren en intestino la acción de bacterias de la flora normal. Por reducción de la doble ligadura del ciclo el colesterol se convierte en *coprostanol* y *colestanol*, compuestos isómeros que representan los principales esteroles en materias fecales. Los ácidos biliares eliminados con las heces alcanzan a unos 500 mg por día, es decir, existe equilibrio entre las cantidades sintetizadas y excretadas, lo cual indica que ambas deben estar reguladas.

La eliminación por vía urinaria de productos derivados de hormonas esteroides representa una proporción muy pequeña del total excretado.

Regulación. La síntesis hepática de colesterol y de ácidos biliares es modulada por el nivel de colesterol libre en las células. El colesterol libre inhibe la etapa catalizada por la 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA (HMG-CoA) reductasa, principal sitio de regulación, activa la acil-CoA-colesterol-acil transferasa (fig. 15-12) y disminuye la concentración de ARNm del receptor de LDL, con lo que se reduce su síntesis.

Los ácidos biliares producidos en los hepatocitos y los reciclados de la circulación enterohepática deprimen la actividad de HMG-CoA reductasa. Además hay otra enzima que interviene en la biosíntesis de ácidos biliares (7α hidroxilasa), cuya actividad es también modulada por el nivel de ácidos biliares.

El interés en el estudio del metabolismo del colesterol surge de su estrecha relación con el problema de la aterosclerosis. Existe correlación directa entre niveles de colesterol total en plasma e incidencia de accidentes coronarios (infartos). Valores de colesterolemia por encima de 240 mg por dL (6,2 mmoles por L), más otros factores antes mencionados, aumentan notablemente el riesgo de padecer ese tipo de accidentes. Valores de HDL menores de 35 mg por dL (0,9 mmoles por L) son también un factor de riesgo de enfermedad coronaria.

El conocimiento del metabolismo del colesterol ha permitido diseñar recursos farmacológicos para reducir los niveles de esta sustancia en sangre. Existen fármacos que inhiben la síntesis de colesterol, actuando sobre HMG-CoA reductasa, lo cual disminuye la concentración intracelular de colesterol y estimula la síntesis de receptores

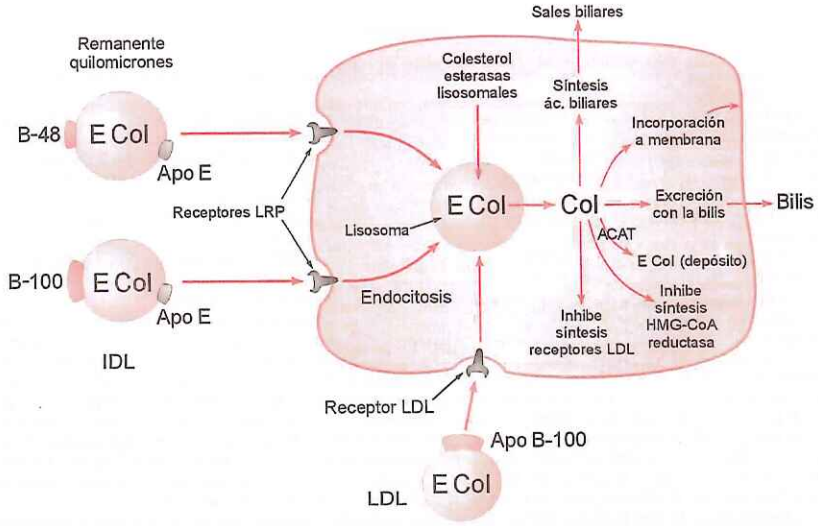


Fig. 15-12. Destinos del colesterol en hepatocitos. El hepatocito es la única célula que posee receptores LRP y LDL (la gran mayoría de las células tiene sólo receptores LDL). Los remanentes de quilomicrones y las IDL son captados por receptores LRP. Las LDL se fijan a receptores LDL. Todas las partículas ingresan a la célula por endocitosis y son degradadas en los lisosomas. Los ésteres de colesterol (ECol) son hidrolizados y dan colesterol libre (Col), que pasa al citosol. El colesterol es utilizado para la síntesis de ácidos biliares, o incorporado a membranas, o excretado sin modificar con la bilis. El resto es esterificado por acil-CoA aciltransferasa (ACAT) y almacenado. Los niveles de colesterol en la célula tienen efectos regulatorios: el aumento de Col deprime su síntesis por inhibición de la HMG-CoA reductasa e inhibe la síntesis de receptores LDL.

LDL. Con ello se favorece la remoción de LDL de la circulación. Por otro lado, el uso de sustancias que fijan ácidos biliares en intestino en forma de complejos no absorbibles bloquea el retorno de ácidos biliares al hígado e incrementa su eliminación por materias fecales. Se utilizan resinas que unen ácidos biliares e impiden su absorción. La reducción del retorno de ácidos biliares al hígado estimula su síntesis, lo cual disminuye la concentración de colesterol intracelular y con ello aumenta la producción de receptores LDL que han de sustraer colesterol de la circulación.

La combinacion de ambos recursos, disminución de la síntesis y aumento de la excreción, permite reducir la colesterolemia en pacientes en los cuales está anormalmente elevada.

Desde hace años se investiga intensamente en este campo, con la esperanza de reducir el alto tributo en vidas humanas, y en calidad de vida, que cobra la aterosclerosis.

Recientemente se han descripto varios trastornos genéticos de la biosíntesis de colesterol. Entre ellos el relativamente más común (1 en 50.000 nacimientos) es el *síndrome de Smith-Lemli-Opitz*, en el cual falta la enzima que cataliza la última reacción de la vía de síntesis, la *7-deshidrocolesterol reductasa*. Los niveles de colesterol en plasma de estos pacientes son muy bajos; hay un cuadro de múltiples malformaciones y alteraciones neurológicas. Otro defecto, muy raro, es la deficiencia de *mevalonato quinasa*, que provoca *aciduria mevalónica*.

RESUMEN

Los lípidos son vehiculizados en el plasma sanguíneo en complejos con proteínas (lipoproteínas), de las cuales existen varias clases:

Quilomicrones. Después de la absorción y resíntesis en mucosa intestinal, los triacilgliceroles con una pequeña proporción de colesterol (Col), son incorporados a quilomicrones, pasan a la linfa y a la circulación general. Estas partículas contienen predominantemente triacilgliceroles (TAG); las proteínas, principalmente apo B-48, representan 1 a 2% de su peso total. Los quilomicrones reciben apo C y E y colesterol esterificado (ECol) de lipoproteínas de alta densidad (HDL). En el endotelio de los capilares existe una lipoproteína lipasa, activada por apo C-II, que hidroliza los TAG. Los ácidos grasos (AG) libres penetran en las células donde son oxidados (músculo) o almacenados, previa incorporación en TAG (tejido adiposo). Los quilomicrones permanecen menos de una hora en circulación. Cuando se ha hidrolizado la casi totalidad de TAG, las apo C son devueltas a HDL. El quilomicrón queda reducido a una partícula residual formada por apos B-48 y E, ECol, fosfolípidos y escasos TAG (remanentes de quilomicrones). Los hepatocitos tienen receptores que fijan estas partículas (LRP) y las retiran de la circulación.

Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Sintetizadas en hepatocitos. La porción proteica está representada por apo B-100, son ricas en TAG. A diferencia de los lípidos de quilomicrones, exógenos, los de VLDL son endógenos. En circulación, las VLDL reciben apos C y E de HDL. En los capilares se hidrolizan los TAG (lipoproteína lipasa, activada por apo C-II). Apo C-II es devuelta a HDL, de las cuales recibe ECol en intercambio por TAG. La vida media de VLDL es de 4 horas. Las VLDL se convierten en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), compuestas por apos B-100 y E, Col, en su mayor parte ECol, y escasa proporción de TAG. Los hepatocitos tienen receptores para IDL y retiran más del 50% de las partículas circulantes. El resto sufre hidrólisis adicional de TAG por lipasa hepática; devuelve apo E a HDL y se convierte en lipoproteínas de baja densidad (LDL). La vida media de las IDL es de 2 a 5 horas. LDL, ricas en ECol, poseen solamente apo B-100; su vida media es de 2,5 días. En todas las células existen receptores específicos para apo B-100 (receptores LDL), que captan LDL y las introducen por endocitosis.

Lipoproteínas de alta densidad (HDL). Sintetizadas en hígado e intestino. Las recién formadas, son discoides, contienen apos A, C y E, lecitina-colesterol-aciltransferasa (LCAT, activada por apoA-I) y fosfolípidos. En sangre, HDL cede apos C y E a VLDL y quilomicrones. En tejidos extrahepáticos HDL se une al endotelio capilar y recibe Col desde el interior de las células; la partícula se agranda y adquiere forma esférica. El Col recibido es esterificado por LCAT y transferido a VLDL y quilomicrones con la participación de la proteína de transporte de ECol. Los remanentes de esas partículas son captados por el hígado; este acarreo de colesterol de tejidos periféricos a hígado, mediado por las HDL es llamado "transporte invertido de colesterol".

Lipoproteína (a). Igual a LDL más apo (a). Su aumento en plasma es factor de riesgo de aterosclerosis.

Receptores. *LDL:* se encuentran en membrana plasmática de todas las células. Su ligando es apo B-100. *LRP (proteína relacionada con receptor LDL)*: principalmente en hígado, reconoce y fija partículas con apo E. *"Recolectores de residuos"*: predominan en macrófagos, son menos específicos. Fijan LDL modificadas (oxidadas).

Metabolismo de grasas. Lipasas intracelulares y lipoproteína lipasa desdoblan TAG en glicerol (Glic) y AG. *Metabolismo del glicerol*: Glic recibe fosfato de ATP y forma Glic-3-P (*gliceroquinasa*). Glic-3-P se convierte en dihidroxiacetona-P (*glicerofosfato deshidrogenasa*, NAD). Dihidroxiacetona-P se convierte en gliceraldehído-3-P (*fosfotriosa isomerasa*). El destino final de estos compuestos es la vía de glucólisis o gluconeogénesis. *Catabolismo de AG*. Los AG de cadena larga son oxidados y utilizados como fuente de energía por muchos tejidos. La degradación se cumple en mitocondrias por un proceso de β-oxidación, después de dos etapas preparatorias: a) Activación: se forma acil-CoA o "AG activo" (*tioquinasa* o *acil-CoA sintetasa*, requiere CoA, ATP y Mg^{2+}). El ATP se hidroliza a AMP y PP_i. b) Transferencia de acil-CoA de citosol a mitocondria: en el citosol, acil-CoA transfiere el acilo a carnitina (*carnitina-aciltransferasa* I). El acilcarnitina atraviesa la membrana interna por un contratransportador acilcarnitina/carnitina; en la matriz el acilo es transferido de nuevo a CoA (*carnitina-aciltransferasa II*). La carnitina vuelve al citosol. El acil-CoA inicia el proceso de β-oxidación, cuyas etapas son: 1. Oxidación. El acil-CoA pierde 2 H de C 2 y 3 (α y β) (*acil-CoA deshidrogenasa*, FAD). Se forma acil-CoA 2-3 insaturado *trans*. 2. Hidratación. Trans-Δ2-enoil-CoA se convierte en 3-hidroxiacil-CoA (*enoil hidratasa*). 3. Segunda oxidación. 3-hidroxiacil-CoA se convierte en 3-cetoacil-CoA (*3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa*, NAD). 4. Liberación de acetil-CoA: 3-cetoacil-CoA es escindido en acetil-CoA y acil-CoA 2 C más corto que el original (*tiolasa*, CoA). La serie de reacciones se repite con el acil-CoA formado. Un AG de 16 C (palmitato) necesita 7 ciclos de β-oxidación para degradarse en 8 acetatos activos. El acetil-CoA puede ingresar al ciclo del ácido cítrico para su oxidación total a CO_2 y H_2O. *Balance energético*: En la etapa de activación inicial se consumen 2 ~P. Cada vuelta de β oxidación produce 5 ATP, 2 en la etapa de deshidrogenación con FAD y 3 en la que interviene NAD. Cada acetil-CoA formado produce 12 ATP en el ciclo del ácido cítrico.

Cetogénesis. Los cuerpos cetónicos son acetoacetato, 3-OH-butirato y acetona. Etapas de la síntesis: 1. Formación de acetoacetil-CoA: a partir de dos acetil-CoA (*tiolasa*). 2. Formación de 3-OH-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA): acetoacetil-CoA más acetil-CoA (*HMG-CoA sintasa*). 3. Formación de acetoacetato: HMG-CoA se escinde en acetoacetato y acetil-CoA (*HMG-CoA liasa*). 4. Formación de 3-OH-butirato: Se reduce acetoacetato (*3-OH-butirato deshidrogenasa*, NAD). 5. Formación de acetona: se descarboxila acetoacetato. *Utilización de cuerpos cetónicos*: músculo, corazón y otros tejidos tienen capacidad de activar acetoacetato y pueden utilizar cuerpos cetónicos como combustible; el hígado no. Hay dos mecanismos: a) Transferencia de CoA desde succinil-CoA (*succinil-CoA-3-cetoácido-CoA, transferasa* o *tioforasa*). b) Acetoacetato se une a CoA (*tioquinasa*, ATP). Para su oxidación final, el acetoacetil-CoA es separado en 2 acetil-CoA (*tiolasa*).

Biosíntesis de AG. Acetil-CoA, principalmente generado por degradación de glucosa y cadenas carbonadas de aminoácidos, es utilizado para sintetizar AG. Catalizada por el sistema multienzimático *ácido graso sintasa*, proteína multifuncional. Primero el acetil-CoA es transferido desde mitocondria al citosol. En matriz mitocondrial, el acetil-CoA reacciona con oxaloacetato y forma citrato (*citrato sintasa*). El citrato es transportado hacia el citosol, donde es escindido en acetil-CoA y oxaloacetato (*citrato liasa*, ATP). El acetil-CoA es utilizado en la síntesis de AG, y el oxaloacetato se reduce a malato (malato deshidrogenasa, NAD). El malato es descarboxilado oxidativamente a piruvato (*enzima málica*, NADP). El piruvato penetra en la matriz, donde se transforma en oxaloacetato (*piruvato carboxilasa*, ATP). El oxaloacetato se une a acetil-CoA y forma citrato, cerrando el ciclo.

Etapas de la síntesis de AG. Formación de malonil-CoA: el acetil-CoA es carboxilado (*acetil-CoA carboxilasa*, biotina, ATP). Etapa regulable. 1. *Transferencia de acetato*: un resto acetilo es transferido desde acetil-CoA al -SH del sitio activo de la enzima condensante (*acetil transferasa*). 2. *Transferencia de malonilo*: el malonilo es transferido al -SH de fosfopanteteína de la *proteína transportadora de acilos* (PTA). 3. *Condensación*: el malonilo se descarboxila y se fija acetilo (*enzima condensante* o *3-acetoacil PTA sintetasa*). Se libera CO_2, el -SH de la enzima condensante es desocupado y el acetoacetil queda unido al -SH de la fosfopanteteína de PTA. 4. *Primera reducción*: acetoacetil-PTA recibe 2 H de NADPH y da 3-OH-butiril-PTA (*3-acetoacetil-PTA reductasa*). 5. *Deshidratación*: se forma 2-enoil-PTA (*3-hidroxiacil deshidratasa*). 6. *Segunda reducción*: se transfieren 2 H de NADPH y se forma butiril-PTA (*enoil reductasa*). A este acilo de 4 C se le agregan sucesivamente restos de 2 C en ciclos iguales al descripto, hasta producir palmitato (16 C). La adición se inicia con transferencia del acilo de 4 C al -SH de enzima condensante. El -SH de fosfopanteteína queda libre y a él se une un resto malonilo. Este se descarboxila, luego recibe el acilo desde la enzima condensante. Después de 7 ciclos se llega a un acilo de 16 C, que se libera por acción de *tiolesterasa*. Los AG de mayor longitud se forman por *elongación* en dos sistemas: mitocondrial y microsomal. *Síntesis de AG insaturados* se realiza por introducción de una doble ligadura entre C 9 y 10. El sistema de desaturación está formado por la *flavoproteína NADH-citocromo b_5 reductasa*, *citocromo b_5* y *Δ9-desaturasa*. Los animales no pueden introducir dobles ligaduras más allá del C 9, razón por la cual los ácidos linoleico y linolénico deben ser administrados con la dieta (*AG esenciales*). El ácido araquidónico puede ser sintetizado a partir de linoleico.

Biosíntesis de eicosanoides. Los precursores son AG de 20 C (eicosanoicos). Prostaglandinas y tromboxanos se sintetizan a partir de araquidonato; la reacción inicial es catalizada por la *cicloxigenasa* (isozimas COX1 y COX2). Los leucotrienos también se forman a partir del araquidonato (*lipo-oxigenasa*).

Biosíntesis de triacilgliceroles (TAG). El glicerol es activado a glicerol-3-P, y el acilo, a acil-CoA; en ambos casos se requiere ATP. Hígado, intestino, riñón y glándula mamaria poseen *gliceroquinasa*; músculo y tejido adiposo, no. Estos utilizan glicerol-3-P formado a partir de dihidroxiacetona-P. Glicerol-3-P es esterificado en los hidroxilos de C 1 y 2 por acil-CoA y forma 1,2-diacilglicerol-P o ácido fosfatídico (*glicero-P-aciltransferasa*). El ácido fosfatídico es hidrolizado (*fosfatasa*) y convertido en 1,2-diacilglicerol. A éste se le transfiere un tercer acilo (*diacilglicerol-aciltransferasa*).

Biosíntesis de fosfolípidos. Ácido fosfatídico también es intermediario en la síntesis de glicerofosfolípidos. Reacciona con CTP y forma CDP-diacilglicerol (*CDP-ácido fosfatídico-citidil transferasa*). Fosfatidilinositol y fosfatidilserina se forman por transferencia de inositol o serina a CDP-diacilglicerol. Fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina requieren activación de colina o etanolamina, fosforiladas (ATP) antes de reaccionar con CTP para formar CDP-colina o CDP-etanolamina. Estas transfieren colina o etanolamina a 1,2-diacilglicerol. *Síntesis de esfingomielina*. Un acilo de acil-CoA es transferido al N de esfingosina para formar ceramida. Luego se transfiere colina de CDP-colina.

Biosíntesis de cerebrósidos y gangliósidos. Restos monosacarídicos son donados a ceramida por nucleótido-azúcares.

Degradación de lípidos complejos. Glicerofosfolípidos requieren un conjunto de enzimas para su total degradación. Fosfolipasas A_1, A_2, B, C y D catalizan la hidrólisis de distintas uniones. Otros PL complejos son degradados por enzimas específicas para cada tipo de enlace: hexosaminidasas, galactocerebrosidasas, esfingomielinasas.

Metabolismo de colesterol. El organismo no depende del aporte exógeno para sus necesidades de Col pues tiene capacidad para sintetizarlo. La síntesis se realiza a partir de acetil-CoA en un proceso que comprende tres fases: 1. *Conversión de acetato en mevalonato*. 2. *Conversión de mevalonato en escualeno*. 3. *Conversión de escualeno en colesterol*. 1. Dos acetil-CoA forman acetoacetil-CoA (*tiolasa*). Acetoacetil-CoA reacciona con otro acetil-CoA y forma 3-OH-3-metilglutaril-CoA (*HMG-CoA sintetasa*). *HMG-CoA reductasa* ligada a NADPH forma mevalonato (etapa regulable). 2. Mevalonato recibe 2 restos fosforilo de ATP, se descarboxila y forma isopentenil-pirofosfato. Dos de estas moléculas forman geranil-pirofosfato (10 C), al cual se le une otro isopentenil-PP y da farnesil-PP (15 C). Dos farnesil-PP forman escualeno (30 C). Se produce reducción (H cedido por NADPH) y eliminación de PP_i. 3. El escualeno se cicliza y sufre algunos cambios para dar lanosterol, el cual pierde metilos y dobles ligaduras y forma colesterol. El colesterol circula en plasma unido a lipoproteínas, principalmente a LDL. Aproximadamente dos tercios del colesterol circulante está esterificado. La formación de ECol se hace en HDL (*lecitina-colesterol aciltransferasa*). El nivel de LDL y Col es mantenido por constante remoción desde todos los tejidos, en los cuales existen receptores LDL que las internan por endocitosis. En las células se produce hidrólisis de ECol (*colesterol esterasa*). El Col es incorporado en membranas y utilizado en síntesis de esteroides. El excedente es esterificado (*acil-CoA-colesterol-aciltransferasa*) y almacenado. El Col libre en la célula regula la síntesis. HMG-CoA reductasa es el principal sitio de regulación. El hígado transforma 300 a 500 mg de Col en ácidos biliares por día. Estos y Col se vierten en el intestino con la bilis. En parte se reabsorben (ciclo enterohepático). La porción no reabsorbida se excreta con las heces como *coprostanol*.

BIBLIOGRAFÍA

Barter P.J., Rye K.A. (1996). Molecular mechanisms of reverse cholesterol transport. *Current Opinion in Lipidology*, 4: 171-176.
Blanco A., Kremer R.D., Taleisnik S. (Eds.).(2000). *Inherited Metabolic Defects*. Academia Nacional de Ciencias, Córdoba.
Dessi M., Noce A., Bertucci P., Manca de Villahermosa S., Zenobi R., Castagnola V., Adessi E., Di Daniele N. (2013). Atherosclerosis, dyslipidemia, and inflammation: the significant role of polyunsaturated fatty acids. *ISRN Inflammation*, 2013: 1-13.
Genest J., Marci P.M., Denis M., Yu L. (1999). High density lipoproteins in health and disease. *Journal of Investigative Medicine*, 47: 31-42.
Hegele R.A. (2009). Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nature Reviews Genetics*. 10: 109-121.
Jensen-Urstad A.P.L., Semenkovich C.F. (2012). Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1821:747-753.
Lamari F., Sedel M.F., Saudubray J.M. (2013). Disorders of phospholipids, sphingolipids and fatty acids biosynthesis: toward a new category of inherited metabolic diseases. *Journal of Inherited Metabolic Diseases*, 36: 411-425

Maccioni H.J.F., Daniotti J.L., Martina J.A. (1999). Organization of ganglioside synthesis in the Golgi apparatus. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1437: 101-118.
Rinaldi P., Matern D., Bennett M.J. (2002). Fatty acid oxidation disorders. *Annual Reviews of Physiology*, 64: 477-502.
Rosen E.D., Spiegelman B.M. (2014). What we talk about when we talk about fat. *Cell*, 156: 20-44.
Rötig A., Munnich A. (2003). Genetic features of mitochondrial respiratory chain disorders. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14: 2995-3007.
Special focus on atherosclerosis. Serie de artículos. (2002). *Nature Medicine*, 8: 1209-1262.

CAPÍTULO 16

Metabolismo de aminoácidos

El papel principal de los aminoácidos es servir de unidades estructurales de proteínas y como materia prima para la síntesis de una variedad de compuestos nitrogenados con actividad fisiológica. También pueden ser utilizados como combustible, pero esta función energética es absolutamente secundaria y reemplazable, con ventajas, por carbohidratos y grasas. En cambio, su participación en la constitución de componentes celulares, hormonas y otras sustancias funcionalmente importantes, es una función insustituible.

A diferencia de carbohidratos y grasas, los aminoácidos no se almacenan en el organismo. Sus niveles dependen del equilibrio entre biosíntesis y degradación de proteínas corporales, es decir, del balance entre anabolismo y catabolismo, conocido como *balance nitrogenado*, ya que las proteínas son la principal fuente de nitrógeno.

En adultos normales, la ingesta de nitrógeno es equilibrada por la excreción en orina y heces. Durante el crecimiento y embarazo, el nitrógeno provisto por los alimentos debe superar al excretado. El exceso se utiliza en síntesis de nuevos constituyentes tisulares; el balance nitrogenado es *positivo*. En casos de desnutrición proteica, procesos febriles severos, diabetes no controlada y neoplasias, por ejemplo, la excreción de nitrógeno supera a la ingesta. En estas situaciones, el balance nitrogenado es *negativo*.

Durante la digestión, las proteínas de la dieta son hidrolizadas hasta sus aminoácidos constituyentes; éstos son absorbidos en intestino y transportados por sangre a los tejidos; penetran a las células mediante sistemas transportadores (págs. 219 y 332). En las células se les ofrecen diferentes alternativas metabólicas: a) utilización, sin modificación alguna, en síntesis de proteínas específicas; b) transformación en compuestos no proteicos de importancia fisiológica; c) degradación para su aprovechamiento con fines energéticos.

Las proteínas tisulares sufren permanente renovación. Proteasas intracelulares se encargan de la hidrólisis de proteínas que han cumplido su ciclo vital. La reposición es total; se produce degradación completa a aminoácidos y resíntesis de nuevas moléculas. En el metabolismo de proteínas no existe alargamiento o acortamiento de cadenas preexistentes, como en glucógeno o ácidos grasos, en los cuales el reemplazo molecular es frecuentemente parcial.

Los aminoácidos liberados por degradación de proteínas endógenas se mezclan con los sintetizados en las células y los procedentes de alimentos. Todos ellos pasan a la sangre y se distribuyen en los tejidos sin distinción entre aminoácidos de diferente origen. Este conjunto de aminoácidos libres constituye un "fondo común" (*pool* en la literatura inglesa) al cual se acude para sintetizar nueva proteína o compuestos nitrogenados.

En el adulto normal se degradan alrededor de 400 g de proteínas por día. Alrededor del 75% de los aminoácidos liberados son reutilizados en la síntesis de proteínas. El resto es destinado a gluconeogénesis, cetogénesis y síntesis de compuestos con diversas funciones. Los aminoácidos sustraídos al fondo común son reemplazados por los provistos con las proteínas de la dieta o son sintetizados en el mismo tejido.

Síntesis de proteínas. El nivel de cada proteína en las células resulta del balance entre las actividades de síntesis y degradación.

Las macromoléculas proteicas son ensambladas en las células por unión de aminoácidos mediante enlaces peptídicos en el orden indicado en los genes. La biosíntesis de proteínas es un complejo proceso que será presentado en el capítulo 22.

Vida media de proteínas. Existen grandes diferencias en la duración de distintas proteínas. Las producidas para "exportación", por ejemplo enzimas digestivas, hormonas, anticuerpos, son degradadas rápidamente; su vida media se mide en horas o días. Aún de más corta duración son las proteínas con funciones regulatorias, como las enzimas que catalizan etapas limitantes de vías metabólicas, factores de transcripción y ciclinas que controlan el ciclo celular (pág. 413). En cambio, las que tienen un papel predominantemente estructural, por ejemplo el colágeno, son más estables y alcanzan una vida media de muchos meses.

Independientemente de las expectativas normales de duración, las proteínas en el organismo están expuestas a agentes deletéreos, particularmente especies reactivas de oxígeno, que afectan su estructura, conformación y actividad biológica. Estas proteínas alteradas son preferentemente atacadas por los sistemas de degradación.

Degradación de proteínas. Existen varios sistemas encargados de eliminar las proteínas al final de su vida útil. Los más importantes son: a) las proteasas encerradas en los *lisosomas* y b) complejos multienzimáticos llamados *proteasomas*. Deben agregarse también las *calpaínas*, cisteína proteasas citosólicas activadas por Ca^{2+} y las *caspasas*, proteasas que participan en el proceso de muerte celular programada o apoptosis (pág. 704).

Lisosomas. Estas organelas contienen diversas hidrolasas con acción sobre proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y carbohidratos. Las proteasas lisosomales son llamadas *catepsinas* y funcionan en medio ácido. En general, los lisosomas tienen a su cargo la hidrólisis de proteínas extracelulares ingresadas por endocitosis, de proteínas citosólicas de vida media larga y las de organelas citoplasmáticas. El proceso de endocitosis ha sido descripto (pág. 220). La digestión de proteínas celulares (autofagia) comprende la formación de vesículas formadas por membranas derivadas del retículo endoplásmico que encierran porciones del citoplasma u organelas enteras. Estas vesículas se fusionan con los lisosomas y forman una cavidad común (autofagosoma) dentro de la cual se produce la proteólisis.

Ubicuitina-proteasomas. Es la principal vía de proteólisis selectiva. Las moléculas a degradar son "marcadas" por inserción de un polipéptido de 76 aminoácidos, llamado *ubicuitina* (Ub), ampliamente distribuido en todas las células.

La fijación de ubicuitina a la proteína es precedida por las siguientes etapas: 1. *Activación de Ub*. Se forma un tioéster entre el carboxilo del resto glicina terminal de Ub y un residuo cisteína en la *enzima activante* o *E1*. La energía necesaria es provista por hidrólisis de ATP. 2. *Conjugación con E2*. La Ub activada es transferida a un residuo cisteína de la *enzima conjugante* o *E2*. 3. *Unión de Ub a E3*. Una nueva transesterificación cede la Ub a *ubicuitina ligasa* o *E3*. La mayoría de las células tienen una E1, pero existen múltiples E2 y E3. Diferentes miembros de las familias E2 y E3 reconocen distintas proteínas como sustrato.

Inserción de Ub en la proteína. La Ub es fijada por su carboxilo terminal al grupo ε amina de un resto lisina de la proteína a degradar. La reacción es catalizada por *ubicuitina ligasa* o E3. Las etapas descriptas se repiten para unir varias subunidades de Ub en tándem. Esta cadena de ubicuitinas habilita a la proteína para acceder a los *proteasomas* (fig. 16-1).

Los proteasomas son complejos de 2.000 kDa y 26 S* formados por gran número de subunidades polipeptídicas. Contienen un núcleo de 20 S que es un cilindro hueco o tubo constituido por la asociación de cuatro anillos de siete subunidades cada uno. En la superficie interna de este tubo se encuentran numerosos sitios catalíticos de proteasas. En ambos extremos del cilindro se disponen, a modo de compuertas o "tapas" de las bocas de acceso, proteínas adicionales, algunas de las cuales tienen actividad ATPasa y otras actúan como ubicuitina hidrolasas. Autores de habla inglesa llaman *caps* a estas formaciones. El *cap* recibe al polipéptido unido a la cadena de ubicuitinas, separa a ésta y la devuelve al citoplasma para su reutilización. La proteína a degradar es introducida en la cavidad del cilindro de 20 S, donde es atacada por las proteasas de la pared interna y queda reducida a péptidos pequeños. Estos péptidos salen al citosol donde son degradados por acción de peptidasas (fig. 16-1).

El sistema ubicuitina-proteasoma es responsable de la eliminación de numerosas proteínas regulatorias, por ejemplo factores de control del ciclo celular como ciclinas, p27, quinasas, la proteína supresora de tumores p53, factores de transcripción, proteínas del sistema de reparación de ADN (pág. 419), subunidad reguladora de proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (pág. 494) y de antígenos (pág. 663).

* S = coeficiente de sedimentación estándar. Es una medida de la velocidad de sedimentación de una partícula sometida a ultracentrifugación

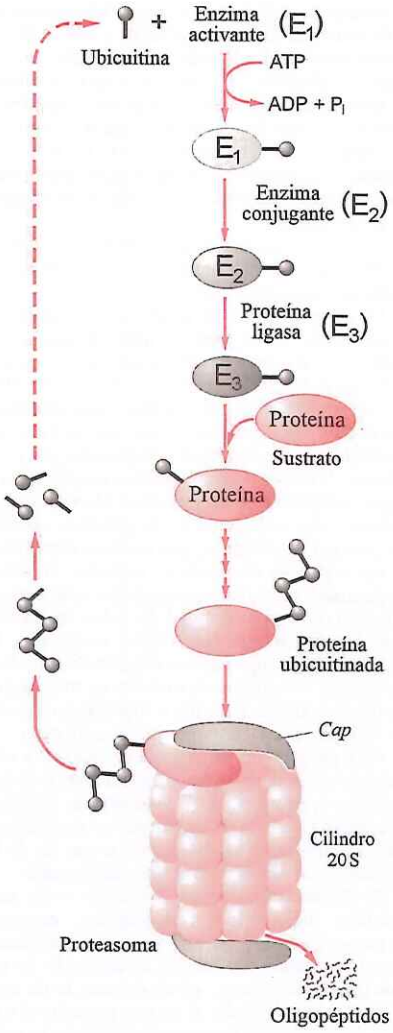


Fig. 16-1. Sistema ubicuitina-proteasoma. En una primera etapa, una molécula de ubicuitina (Ub) se une a la enzima activante (E1). Luego es transferida a la enzima conjugante (E2). La ligasa (E3) cataliza la unión de Ub a la proteína sustrato. Esta etapa puede realizarse por transferencia directa de Ub desde E2 al sustrato o previa formación de un intermediario Ub-E3 como se indica en la figura. Estos pasos se repiten para formar una cadena de poliUb. El sustrato es captado por el proteasoma, la cadena de poliUb es hidrolizada y sus subunidades son reutilizadas. La proteína sustrato penetra en la cavidad del proteasoma, donde es degradada a oligopéptidos.

En las células, distintas proteínas tienen diferente vida media. En esto influyen ciertos aspectos estructurales. Cuando la serina es el aminoácido N-terminal la proteína tiene una duración de más de 24 horas, en cambio, si poseen aspartato, su vida media es de unos pocos minutos. También son de vida corta las que presentan secuencias prolina-glutamato-serina-treonina (secuencia PEST). Otras que tienen prioridad para su degradación son las proteínas "marcadas" con ubicuitina o portadoras de defectos o alteraciones.

Además de la degradación normal de proteínas se produce, durante períodos de inanición celular, hidrólisis de proteínas citosólicas poseedoras de secuencias señalizadoras (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln). Estas ingresan a través de la membrana lisosomal y son desplegadas por asociación a proteínas de la familia de las chaperonas Hsp70 (pág. 475). Generalmente se trata de proteínas de vida media larga, funcionalmente no esenciales para la célula. En condiciones de inanición, estas proteínas son sacrificadas a fin de proveer aminoácidos y energía para actividades más críticas.

La destrucción de proteínas mediada por ubicuitina juega un papel muy importante en la regulación del ciclo celular, reparación de ADN, crecimiento celular y sistema inmunitario. Su disfunción contribuye al desarrollo de neoplasias, enfermedades neurodegenerativas y trastornos del sistema inmunitario.

Aminoácidos esenciales

Experimentos nutricionales permitieron clasificar los aminoácidos en esenciales y no esenciales. Los *aminoácidos esenciales* o *indispensables* deben ser suministrados en la dieta en cantidades adecuadas a fin de mantener el crecimiento en niños y jóvenes, o el equilibrio nitrogenado en adultos, pues el ser humano no dispone de vías metabólicas para sintetizarlos.

Los aminoácidos no esenciales o dispensables son sintetizados en el organismo; su administración en la dieta no es obligatoria. Sin embargo, la presencia de aminoácidos dispensables en la alimentación disminuye los requerimientos de aminoácidos esenciales. Si aquéllos no se proveen, el organismo debe sintetizarlos a partir de aminoácidos esenciales.

La tabla 16-1 indica el requerimiento diario mínimo de aminoácidos indispensables en adultos cuando el aporte adicional de nitrógeno y carbono para síntesis de aminoácidos no esenciales está asegurado.

Tabla 16-1. Requerimiento mínimo diario de aminoácidos indispensables para un humano adulto normal.

L-fenilalanina	1,1 g	L-metionina	1,1 g
L-isoleucina	0,7 g	L-treonina	0,5 g
L-leucina	1,1 g	L-triptófano	0,25 g
L-lisina	0,8 g	L-valina	0,8 g

A estos ocho aminoácidos deben agregarse, como relativamente esenciales, arginina e histidina, sintetizados en el organismo en cantidad insuficiente para atender demandas incrementadas como las del crecimiento, embarazo o lactancia.

En ciertos casos la lista de aminoácidos indispensables se amplía; un aminoácido no esencial puede convertirse en esencial. Por ejemplo, existe un defecto genético en el cual hay un bloqueo de la reacción que convierte fenilalanina en tirosina; en esta enfermedad, llamada fenilcetonuria, la tirosina resulta indispensable. Otros errores congénitos pueden tornar esenciales a aminoácidos que no lo son; por ejemplo, a la cisteína, que normalmente se forma a partir de metionina.

En niños prematuros, la inmadurez funcional no permite la síntesis de algunos aminoácidos no esenciales como cisteína o prolina. En la insuficiencia hepática grave está afectada la capacidad para producir tirosina o cisteína.

Por otro lado, si se administran α-cetoácidos con la misma cadena carbonada que leucina, isoleucina, valina, triptófano, metionina o fenilalanina, estos aminoácidos pueden ser sintetizados por agregado de un grupo amina catalizado por aminotransferasas. La lisina, treonina e histidina, que no participan de manera apreciable en reacciones de transaminación (ver más adelante), no son reemplazables por sus cetoácidos.

Requerimiento de proteínas

Las proteínas son componentes obligatorios de toda dieta normal, ya que proveen los aminoácidos necesarios para elaborar las proteínas y otros compuestos nitrogenados del propio organismo y mantener el balance nitrogenado. La síntesis de proteínas en la célula se frena cuando falta un solo aminoácido aunque se disponga de los otros, ya que requiere la presencia simultánea de todos los aminoácidos en cantidades adecuadas.

En adultos se recomiendan 0,8 g de proteína por kg de masa corporal y por día. En embarazadas deben adicionarse 30 g por día durante todo el período de gestación. En la lactancia hay que agregar 20 g de proteína por día para cubrir las necesidades de síntesis de proteínas de la leche. El requerimiento de lactantes de hasta la edad de 1 año es de 2 g/kg/día; niños de 1 a 10 años, 1,2 g/kg/día y adolescentes, 1 g/kg/día. En todos los grupos de edades, las necesidades aumentan ante procesos que incrementan el catabolismo (sepsis, trauma, cirugía).

Para una alimentación correcta no sólo debe tenerse en cuenta la cantidad de proteínas ingeridas, sino especialmente su calidad desde el punto de vista nutritivo.

La calidad de una proteína depende de su digestibilidad y, principalmente, de su contenido en aminoácidos indispensables.

La digestibilidad se refiere a la cantidad de aminoácidos de la proteína ingerida que se absorbe. Las proteínas de origen animal son de 90 a 99% digeribles, las de origen vegetal, de 70 a 80%.

Las proteínas de alta calidad, también llamadas *completas*, contienen todos los aminoácidos esenciales en las cantidades requeridas por el ser humano. Son fuentes de proteínas completas las de origen animal (de la leche, carnes blancas y rojas, huevos). Una excepción es la gelatina, obtenida por cocción de colágeno, que no tiene triptófano.

En vegetales (legumbres, cereales, verduras) predominan proteínas incompletas, que carecen o poseen muy baja cantidad de uno o varios aminoácidos indispensables. Como excepción, las proteínas de la soja pueden considerarse de buena calidad. En granos de cereales es muy baja la cantidad de lisina, treonina o triptófano, mientras las legumbres son muy pobres en metionina.

Para asegurar el suministro de todos los aminoácidos esenciales, la dieta debe incluir proteínas animales o, en un régimen vegetariano, combinar legumbres y granos de modo que se complementen las deficiencias de las primeras con las de los segundos y se alcance un aporte satisfactorio.

Se llama aminoácidos *limitantes* a los aminoácidos indispensables requeridos, presentes en menor cantidad en una proteína, comparada con el contenido del mismo aminoácido en una proteína de referencia, generalmente la de clara de huevo. Por ejemplo, si en una proteína el triptófano es el de más baja concentración y su valor es un 50% del existente en la clara de huevo, a la proteína en cuestión le corresponde un puntaje de 50. Otra definición de aminoácidos limitantes refiere a los amino ácidos esenciales en una proteína que no alcanzan a la cantidad requerida por el ser humano. La cantidad de aminoácidos es determinada por el Comité de expertos en calidad proteica de la FAO/OMS, comparando la cantidad de amino ácidos esenciales por gramo de proteína requerida, por ejemplo, por niños de 2 a 5 años.

Para evaluar la calidad de una proteína, después de determinar la cantidad de aminoácidos esenciales que contiene se la divide por la existente en la proteína de huevo y se multiplica por 100. El valor óptimo de esta estimación de la calidad es 100.

Valor biológico. El concepto de *valor biológico* de una proteína está en relación directa con su digestibilidad y contenido en aminoácidos esenciales. Se lo puede expresar cuantitativamente si se mide el N retenido en el organismo después de la ingesta de la proteína, comparado con el correspondiente a la misma cantidad de la proteína de referencia. Un valor biológico de 100, igual al de la proteína de huevo, indica que el 100% del N absorbido es incorporado.

Para un aprovechamiento eficiente de las proteínas de la dieta, deben cubrirse las necesidades energéticas principalmente con carbohidratos y grasas. Si la provisión de calorías aportadas por glúcidos y lípidos de la dieta es baja, el organismo es obligado a oxidar aminoácidos para obtener energía, lo que aumentaría la cantidad de proteínas a consumir.

Una alimentación pobre en proteínas es la causa más frecuente de desnutrición, uno de los problemas sanitarios y sociales más graves de la humanidad. Son los países subdesarrollados y los niños los más vulnerables a este flagelo, que acompaña a la pobreza y la marginalidad.

Los cuadros más serios de malnutrición proteica son el kwashiorkor y el marasmo.

Kwashiorkor, vocablo de origen africano, es observado en niños con dietas muy pobres en proteínas de buena calidad y ricas en carbohidratos. Se caracteriza por retardo marcado en el crecimiento, abdomen abultado, edema, disminución de albúmina en plasma, anemia, hepatomegalia.

Marasmo, producido por deficiencia crónica de proteínas y calorías en la dieta. Hay pérdida total de grasa corporal y de gran parte de la masa de tejido muscular. Es un proceso de consunción severa.

Destino de los aminoácidos

Los caminos reservados a aminoácidos en el organismo son:

1) La mayor parte de aminoácidos del "fondo común" son utilizados sin modificar en la síntesis de nueva proteína. Dedicaremos un capítulo (cap. 22) al estudio de la síntesis de proteínas.

2) Vías metabólicas específicas producen, a partir de determinados aminoácidos, compuestos nitrogenados no proteínicos con importantes fun-

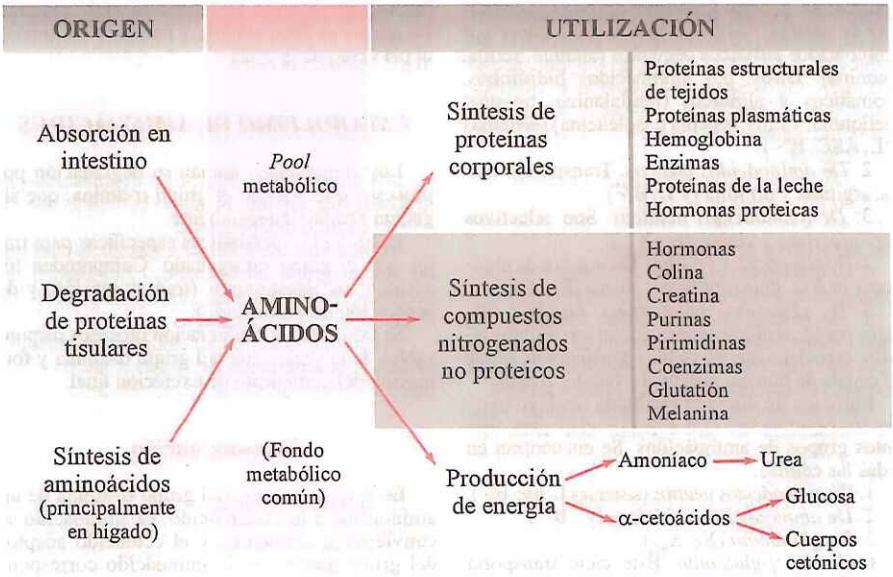


Fig. 16-2. Resumen del metabolismo de aminoácidos.

ciones. En el curso de este capítulo se presentarán algunas de estas vías.

3) Aminoácidos no utilizados en síntesis de proteínas ni sustancias fisiológicamente activas son degradados y finalmente oxidados con producción de energía. Este proceso implica separación y eliminación del grupo amina.

La figura 16-2 presenta un resumen de las posibilidades metabólicas de los aminoácidos.

Transporte de aminoácidos

Los aminoácidos atraviesan membranas celulares gracias a sistemas de transporte específicos que sólo reconocen a los isómeros L. Se han caracterizado diversos transportadores, agrupados en dos categorías: a) *Transporte activo secundario*. Utilizan el gradiente electroquímico de sodio creado por la Na^+,K^+-ATPasa. Son cotransportadores Na^+/aminoácido que acumulan aminoácidos en la célula aun contra gradiente. b) *Difusión facilitada*. Son *uniporters* no dependientes de Na^+; dejan pasar aminoácidos a favor del gradiente. Entre los primeros se han descripto varios, algunos de los cuales han sido mencionados en pág. 219):

1. De *aminoácidos neutros*. Se han identificado distintos transportadores de aminoácidos neutros; en general presentan amplia especificidad de sustrato. Algunos tienen preferencia por aminoácidos alifáticos pequeños (alanina, serina, treonina). Otros, por aminoácidos hidrófobos, aromáticos y alifáticos (fenilalanina, tirosina, metionina, valina, leucina e isoleucina) (sistemas y^+L, ASC, $B^{o,+}$).

2. *De aminoácidos básicos*. Transportan lisina, arginina y ornitina (y^+L, $B^{o,+}$).

3. *De aminoácidos acídicos*. Son selectivos para aspartato y glutamato (X_{AG}).

4. *De iminoácidos y glicina*. Encargados de transportar prolina, hidroxiprolina y glicina (Pro, Gly).

5. *De glutamina, asparragina, histidina* (N). Estos transportadores se encuentran en distintos tejidos, especialmente en células epiteliales de borde en cepillo de mucosa intestinal y túbulos renales.

Entre los de difusión facilitada también existen transportadores con especificidad para distintos grupos de aminoácidos. Se encuentran en todas las células.

1. *De aminoácidos neutros* (sistemas L, asc, $b^{o,+}$).
2. *De aminoácidos catiónicos* (y^+, $b^{o,+}$).
3. *De glutamato* (X_C, x_{AG}).

Ciclo del γ-glutamilo. Este ciclo transporta aminoácidos en varios órganos, principalmente hígado, riñón e intestino (pág. 352).

Defectos genéticos en el transporte de aminoácidos. Se han descripto enfermedades debidas a alteraciones de genes que codifican proteínas componentes de sistemas de transporte de aminoácidos.

Enfermedad de Hartnup. La falla comprende al transportador de aminoácidos neutros aromáticos y alifáticos hidrófobos. Se transmite como carácter autosómico recesivo. Los pacientes tienen incapacidad para absorber aminoácidos neutros en intestino y túbulos renales. Los niveles de estos aminoácidos en plasma están por debajo de lo normal. Hay excreción elevada de aminoácidos por orina (aminoaciduria). Se puede producir avitaminosis (pelagra) por falta de triptófano, precursor de ácido nicotínico, vitamina del complejo B (pág. 593). Pero, en general, los pacientes no presentan carencias graves de aminoácidos esenciales porque los transportadores de di- y tripéptidos en intestino permiten incorporar aminoácidos cuyo ingreso individual está bloqueado.

Cistinuria. La mutación afecta al transportador de aminoácidos básicos y cistina. La herencia es autosómica recesiva. Es el más frecuente de los defectos genéticos relacionados con aminoácidos (se da en 1 de cada 7.000 nacimientos). Los niveles de cistina, lisina, arginina y ornitina en orina son 20 a 30 veces superiores a lo normal. El principal problema de estos pacientes es la formación de cálculos de cistina en vías urinarias. La cistina es poco soluble y precipita fácilmente al pH ácido de la orina.

CATABOLISMO DE AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos inician su degradación por procesos que separan el grupo α-amina, que sigue un camino independiente.

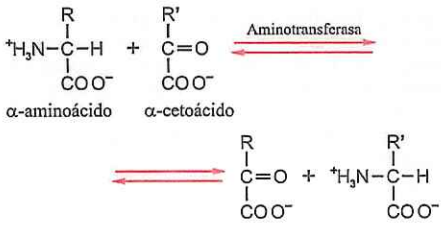
Existen vías metabólicas específicas para tratar con el grupo nitrogenado. Comprenden reacciones de transferencia (transaminación) y de separación (desaminación).

Se estudiarán a continuación procesos responsables de la separación del grupo α-amina y formación del compuesto de excreción final.

Transaminación

Es la transferencia del grupo α-amina de un aminoácido a un α-cetoácido. El aminoácido se convierte en cetoácido, y el cetoácido aceptor del grupo amina, en el aminoácido correspondiente.

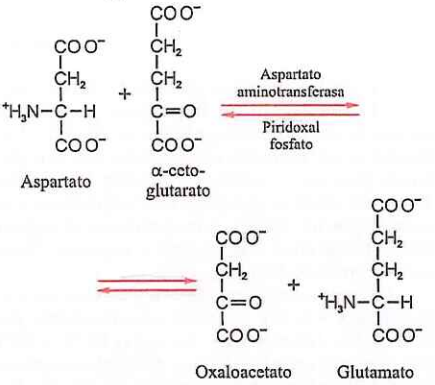
La ecuación general es:



Esta reacción, fácilmente reversible, es catalizada por *transaminasas* o *aminotransferasas;* utilizan la coenzima piridoxal fosfato, unida firmemente a la enzima.

El piridoxal fosfato es una coenzima muy importante en metabolismo de aminoácidos. Es derivado de piridoxina, vitamina del complejo B (pág. 597). Participa en numerosas reacciones que afectan a aminoácidos. En todos los casos, el piridoxal fosfato forma con el aminoácido un compuesto intermediario, una base de Schiff (fig. 16-3). Todas las uniones al carbono α del aminoácido resultan "labilizadas", facilitando diversas reacciones (transferencia del grupo amina, descarboxilación y otras). La enzima participante en cada caso se encarga de "guiar" la reacción en determinado sentido y asegurar la naturaleza del cambio a producir. Las aminotransferasas catalizan la separación y transferencia del grupo amina unido al carbono α. El piridoxal fosfato sirve de aceptor y transportador del grupo amina.

La transaminación es una reacción bimolecular cuyo mecanismo es bien conocido. En primer lugar, el aminoácido se une al sitio activo, formando una base de Schiff con piridoxal fosfato. Luego, por hidrólisis, se desprende el α-cetoácido correspondiente al aminoácido original. El grupo prostético de la enzima queda convertido en piridoxamina fosfato. Posteriormente ingresa al sitio catalítico el segundo reactivo, un α-cetoácido, que forma una base de Schiff con piridoxamina fosfato. El grupo amina es transferido al cetoácido, se regenera piridoxal fosfato y se libera el aminoácido correspondiente. Los dos sustratos se unen sucesiva e independientemente a la enzima y el primer producto se desprende antes de fijarse el segundo sustrato. El piridoxal fosfato actúa como aceptor transitorio del grupo amina. Es común en estas reacciones que el α-cetoácido sea el α-cetoglutarato; en este caso el nombre de la enzima tiene en cuenta el aminoácido donante de amina. Así, la *aspartato aminotransferasa* cataliza en ambos sentidos la siguiente reacción:



Esta reacción es particularmente importante en hígado. En la reacción inversa, el oxaloacetato actúa como aceptor del grupo amina cedido por glutamato. El aminoácido resultante, aspartato, actúa como donante de nitrógeno en la síntesis de urea.

La *alanina aminotransferasa* es responsable de la reacción:

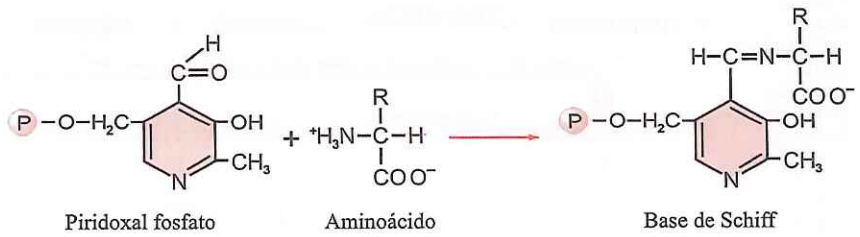
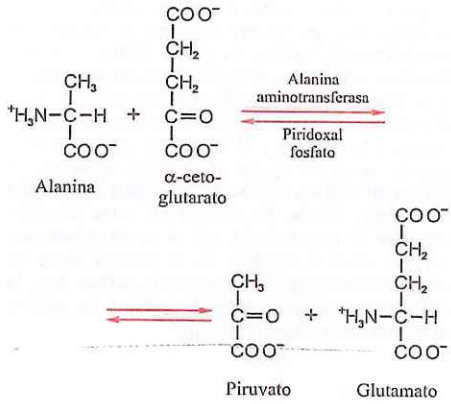


Fig. 16-3. Formación de una base de Schiff (aminoácido-piridoxal fosfato).



Uno de los sustratos/productos de esta reacción, la alanina, es un importante portador de amina. En músculo estos grupos amina son transferidos desde distintos aminoácidos a α-cetoglutarato para dar glutamato y de éste a piruvato. Se forma alanina, que pasa a la circulación y es captada por los tejidos, principalmente el hígado, donde transamina nuevamente y regenera glutamato y piruvato (ver pág. 392).

Aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa son los nombres recomendados por la IUBMB; sin embargo, las siglas GOT y GPT (de glutámico-oxaloacético y glutámico-pirúvico transaminasas) se utilizan mucho en clínica. Estas dos aminotransferasas son particularmente abundantes en hígado y corazón, razón por la cual en procesos patológicos de estos órganos (por ej., hepatitis e infarto de miocardio) se produce aumento de su concentración en plasma sanguíneo. La determinación de estas enzimas se realiza frecuentemente con fines diagnósticos y pronósticos.

Otros ejemplos de reacciones de transaminación:

L-fenilalanina + α-cetoglutarato $\rightleftharpoons$ (Fenilalanina aminotransferasa) Fenilpiruvato + L-glutamato

L-leucina + α-cetoglutarato $\rightleftharpoons$ (Leucina aminotransferasa) α-cetoisocaproato + L-glutamato

Todas estas reacciones transcurren fácilmente en ambas direcciones.

Algunas aminotransferasas presentan dos isozimas con distinta localización intracelular; una forma citosólica y otra de matriz mitocondrial.

A excepción de lisina y treonina, todos los aminoácidos participan en reacciones de transaminación con los α-cetoácidos piruvato, oxaloacetato o α-cetoglutarato, que se convierten en alanina, aspartato o glutamato respectivamente; los aminoácidos originales forman los α-cetoácidos correspondientes. A su vez, la alanina y el aspartato, formados por transaminación a partir de piruvato y oxaloacetato, reaccionan con α-cetoglutarato. Los grupos amina son canalizados hacia la formación de glutamato (fig. 16-4).

En las transaminaciones el grupo amina del aminoácido no es eliminado, sino transferido a

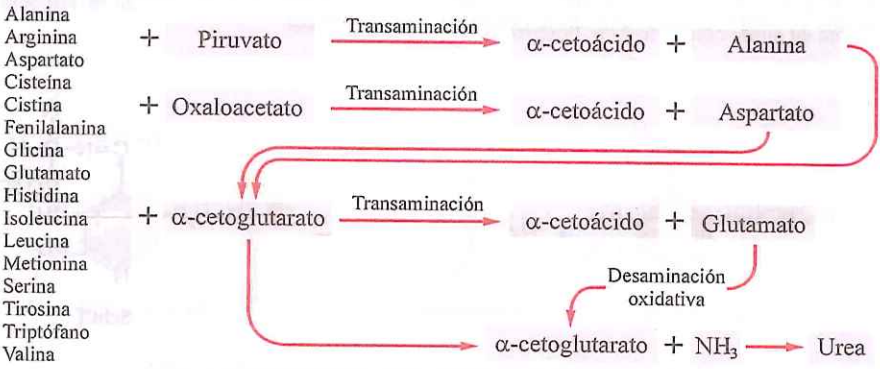


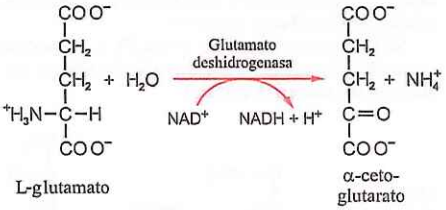
Fig. 16-4. Destino final del grupo amina de aminoácidos.

un cetoácido para formar otro aminoácido. Por esta razón, la reacción no sólo sirve de primera etapa en la degradación de aminoácidos, cuya cadena carbonada queda libre de nitrógeno, sino también como último paso en la síntesis de aminoácidos. A través de transaminaciones, el organismo puede generar aminoácidos si dispone de los α-cetoácidos correspondientes.

Desaminación de glutamato

El α-cetoglutarato es el sustrato más frecuentemente comprometido en transaminaciones. A él convergen, para formar glutamato, grupos amina procedentes de casi todos los aminoácidos.

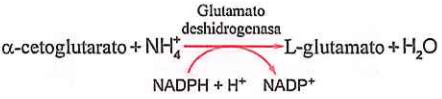
El grupo nitrogenado del glutamato puede ser separado por desaminación oxidativa catalizada por *glutamato deshidrogenasa*. Esta enzima, muy activa en la mayoría de tejidos de mamíferos, utiliza las coenzimas NAD y NADP. En la reacción directa, generalmente participa NAD^+ y se forma α-cetoglutarato y amoníaco.



La mayor parte del amoníaco producido en el organismo se genera en los tejidos a través de esta reacción. Al pH fisiológico, el amoníaco (NH_3) capta un protón y se convierte en ion amonio (NH_4^+).

La glutamato deshidrogenasa se encuentra en la matriz mitocondrial. Es una enzima alostérica, activada por ADP y GDP, e inhibida por ATP y GTP. Cuando el nivel de ADP en la célula es elevado, la enzima es activada. El aumento en la producción de α-cetoglutarato alimenta el funcionamiento del ciclo de Krebs y genera ATP. Cuando la célula dispone de abundante ATP y GTP (este último producido en la reacción catalizada por succinato tioquinasa) la glutamato deshidrogenasa es inhibida, se reduce el aporte de α-cetoglutarato al ciclo y se deprime la actividad del mismo.

La reacción es reversible, el amoníaco se une a α-cetoglutarato para formar glutamato. Al parecer, mientras en la reacción directa se utiliza preferentemente coenzima NAD, en la inversa participa frecuentemente NADP reducido.



La utilización de coenzimas distintas según el sentido de la reacción permitiría la regulación independiente de desaminación y aminación.

Como la reacción es reversible, la glutamato deshidrogenasa actúa tanto en la vía catabólica como en la síntesis de glutamato.

Existen otras enzimas que catalizan la desaminación oxidativa de aminoácidos; son flavoproteínas llamadas *aminoácido oxidasas*. Su papel en tejidos humanos es de escasa importancia.

Desamidación. Los grupos amida de asparragina y glutamina son liberados como amoníaco por hidrólisis catalizada por asparraginasa y glutaminasa respectivamente. Se producen aspartato y glutamato; el amoníaco es protonado para dar amonio (NH_4^+).

VÍAS METABÓLICAS DEL AMONÍACO

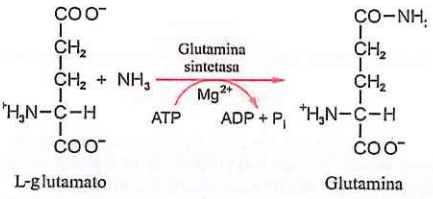
La principal fuente de amoníaco en el organismo es la desaminación oxidativa de glutamato en diversos tejidos. Además se produce amoníaco en cantidades apreciables por acción de bacterias de la flora intestinal sobre los restos de alimentos nitrogenados. Este amoníaco se absorbe y pasa a la circulación portal. En condiciones normales los niveles en sangre se mantienen muy bajos (10 a 50 μg por dL o 5 a 30 μM), lo cual indica gran eficiencia de los mecanismos encargados de eliminarlo.

Esto es muy importante dada la toxicidad del amoníaco, especialmente para el sistema nervioso central. Como el hígado es el principal órgano de remoción, en casos de insuficiencia hepática grave, la amoniemia asciende y se producen cuadros de intoxicación con graves consecuencias (encefalopatía, coma y muerte).

La más importante vía de eliminación de amoníaco en el ser humano es la síntesis de urea. Otro mecanismo es la formación de glutamina.

Formación de glutamina

El amoníaco es unido a glutamato por acción de *glutamina sintetasa*, enzima mitocondrial que cataliza la formación del enlace amida a expensas de energía cedida por la hidrólisis de ATP a ADP y P_i. La reacción es prácticamente irreversible.



La síntesis de glutamina es un mecanismo de eliminación de amoníaco importante en diversos tejidos. En el hígado se cumple principalmente en los hepatocitos que rodean la vena central de los lobulillos. La actividad glutamina sintetasa es también notable en músculo, riñones y cerebro. Este órgano, particularmente sensible a la presencia de amoníaco, se desembaraza de él formando glutamina.

La glutamina es hidrolizada a ácido glutámico y amoníaco por acción de la *glutaminasa*. Como la reacción de síntesis de glutamina es irreversible, su hidrólisis no se realiza por inversión del mismo proceso sino por un mecanismo distinto.

La glutaminasa se encuentra en hepatocitos periportales y en otras células, entre ellas las de túbulos renales, donde la producción de amoníaco y su eliminación por orina es uno de los mecanismos de regulación del equilibrio ácido-base y de conservación de cationes (pág. 628).

Una reacción similar es catalizada por *asparraginasa*, que hidroliza asparragina a aspartato y amoníaco.

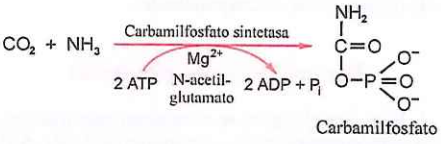
Algunos tumores requieren para su desarrollo cantidades elevadas de glutamina y asparragina. Por ello se han utilizado glutaminasa y asparraginasa como agentes antitumorales.

Formación de urea

La casi totalidad del amoníaco originado por desaminación es convertido en urea en el hígado, único órgano que dispone de todas las enzimas necesarias para esa conversión.

La síntesis de urea se realiza principalmente en los hepatocitos que rodean los vasos del sistema porta por un mecanismo en ciclo descripto originalmente por Krebs y Henseleit en 1932. En el ciclo participan cinco enzimas, y como alimentadores ingresan amoníaco, anhídrido carbónico y aspartato, que cede su grupo α-amina. El proceso consume cuatro enlaces fosfato de alta energía por cada molécula de urea. Comprende las siguientes reacciones:

1. **Síntesis de carbamilfosfato.** La condensación de amoníaco, anhídrido carbónico y fosfato (derivado de ATP) para formar carbamilfosfato es catalizada por *carbamilfosfato sintetasa 1* (CPS-1), presente en mitocondrias de hígado.

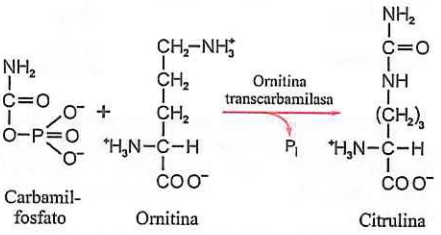


Se hidrolizan dos moléculas de ATP. La enzima requiere Mg^{2+} y N-acetilglutamato, que actúa como activador alostérico.

Existen dos isozimas de carbamilfosfato sintetasa; la CPS-2, localizada en citosol de casi todas las células, participa en la síntesis de nucleótidos de pirimidina (pág. 372).

2. **Síntesis de citrulina.** La porción carbamilo es transferida desde carbamilfosfato a ornitina, primer intermediario del ciclo.

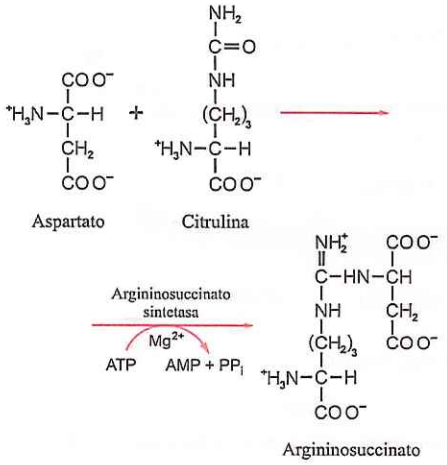
Se forma citrulina y se libera P_i. La reacción es catalizada por *ornitina transcarbamilasa*, enzima de matriz mitocondrial.



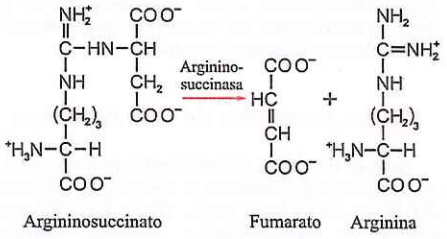
El equilibrio de la reacción está fuertemente desplazado hacia la derecha.

Las etapas siguientes se producen en el citosol y la citrulina debe abandonar la mitocondria. Para ello utiliza un sistema de contratransporte.

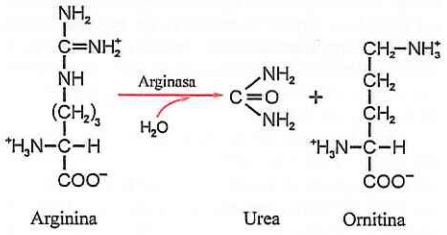
3. **Síntesis de argininosuccinato.** En esta reacción ingresa al ciclo otro de sus alimentadores, aspartato, que se une a citrulina para formar argininosuccinato. La enzima responsable es *argininosuccinato sintetasa*. Se requiere ATP, el cual se hidroliza a AMP y pirofosfato inorgánico (PP_i). El proceso es prácticamente irreversible debido a la rápida hidrólisis del pirofosfato.



4. **Ruptura de argininosuccinato.** La escisión de argininosuccinato es catalizada por *argininosuccinasa*, una liasa. El esqueleto carbonado del aspartato ingresado en la reacción anterior es liberado como fumarato y el grupo amina pasa a formar parte de la cadena lateral de arginina.



5. **Hidrólisis de arginina.** En la última etapa del ciclo se hidroliza el grupo guanidina de la arginina y se forma urea y ornitina. Se regenera ornitina, primer intermediario del ciclo. La *arginasa* es la enzima responsable de la reacción.



La urea, producto final liberado en cada vuelta del ciclo, difunde desde el hígado a la circulación general. Los riñones son los principales órganos de excreción; por orina se elimina alrededor del 75% de la urea formada. El resto pasa al colon, donde es hidrolizado por *ureasa* de bacterias de la flora normal y se produce amoníaco, que vuelve al hígado por la vena porta.

La ornitina inicia otra serie de reacciones uniéndose a un resto carbamilo. Para ello debe penetrar en las mitocondrias utilizando un sistema de contratransporte (*antiporter*) citrulina/ornitina de membrana interna.

La figura 16-5 presenta las etapas del ciclo, con la compartimentalización mencionada.

Consideraciones sobre el ciclo de la urea

La ecuación total del ciclo de la urea es:

$$CO_2 + NH_3 + 3\ ATP + Aspartato + H_2O \longrightarrow$$
$$\longrightarrow Urea + 2\ ADP + 2\ P_i + AMP + PP_i + Fumarato$$

Las dos primeras etapas de esta vía se cumplen dentro de las mitocondrias. El carbamilfosfato que participa en la formación de urea es sintetizado en la matriz mitocondrial, donde se encuentra la isozima de *carbamilfosfato sintetasa* propia de la organela (CPS-1). La síntesis de bases pirimídicas también requiere carbamilfosfato, producido en el citosol, en reacción catalizada por la isozima citosólica de carbamilfosfato sintetasa (CPS-2), distinta de la anterior. Esta compartimentalización de isozimas permite mantener la independencia de las vías metabólicas, regularlas separadamente y evitar interferencias en la utilización de sustratos y productos.

Los dos nitrógenos de la urea proceden de aminoácidos participantes en transaminaciones. El amoníaco ingresado en la primera reacción proviene principalmente de la desaminación oxidativa de glutamato, formado por transferencia de amina desde otro aminoácido a α-cetoglutarato. El segundo nitrógeno es cedido por aspartato y deriva de transaminaciones con oxaloacetato. De este modo, al ciclo de Krebs-Henseleit converge la casi totalidad de restos nitrogenados de los aminoácidos catabolizados. El producto final, urea, es un compuesto inocuo, fácilmente excretable.

El fumarato liberado en la reacción 4 es intermediario del ciclo del ácido cítrico. En este ciclo, el fumarato es hidratado a malato y éste oxidado a oxaloacetato.

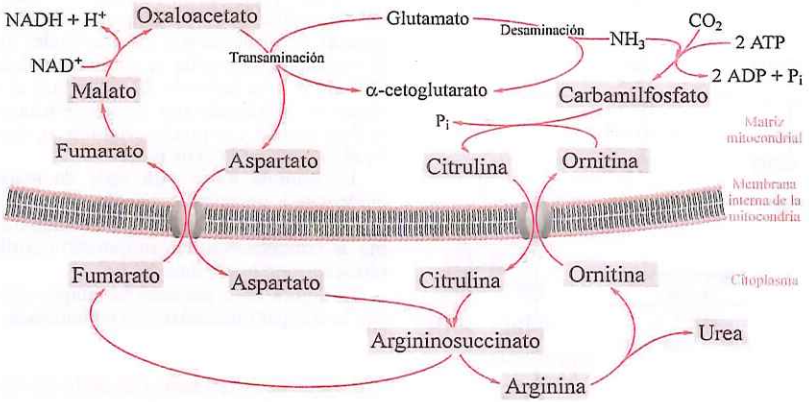


Fig. 16-5. Ciclo de Krebs-Henseleit o de la urea. Compartimentalización celular de las etapas del ciclo.

El oxaloacetato dispone de las siguientes alternativas metabólicas: a) condensarse con acetil-CoA para formar citrato (primera etapa del ciclo del ácido cítrico), b) convertirse en fosfoenolpiruvato en reacción catalizada por fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (etapa de la gluconeogénesis), c) formar aspartato por transaminación, alimentando el ciclo de formación de urea. Esta reacción y el fumarato conectan los ciclos de urea y ácido cítrico de manera que el funcionamiento del segundo "motoriza" al primero (fig. 16-6). La síntesis de urea requiere cuatro uniones ~Ⓟ, mientras la oxidación que tiene lugar de fumarato a aspartato (malato→oxaloacetato) (fig. 16-6) genera tres ATP que contribuyen a sostener el proceso total dentro de la célula.

El funcionamiento eficiente del ciclo de la urea requiere, además de las enzimas propias del ciclo, otras adicionales como glutaminasa hepática y N-acetil-glutamato sintetasa y los intercambiadores ornitina/citrulina y aspartato/fumarato de membrana mitocondrial interna.

Un adulto normal, con dieta equilibrada, elimina alrededor de 25 a 30 g de urea diarios por orina, lo cual corresponde a 90% del nitrógeno total excretado por esta vía. La cantidad de urea eliminada está relacionada con la ingesta de proteínas; las otras sustancias nitrogenadas de orina, principalmente ácido úrico, creatinina, amoníaco y aminoácidos, mantienen niveles más o menos constantes y relativamente independientes de la cantidad de alimentos nitrogenados ingeridos.

La urea es soluble, fácilmente difusible a través de membranas celulares y atóxica. Se encuentra en sangre circulante en concentración de 20 a 30 mg por dL (término medio 0,4 mM). El nivel aumenta en casos de insuficiencia renal. Se habla de *uremia* en situaciones de insuficiencia renal. El cuadro tóxico de los enfermos con uremia no se debe al aumento de urea en sangre y tejidos, sino al incremento de otros catabolitos nocivos que el riñón no puede eliminar. Además de producir urea, el ciclo sirve como vía de síntesis de arginina; por esta razón, este aminoácido no es esencial en adultos en balance nitrogenado y sólo debe agregarse en la dieta en condiciones de requerimiento aumentado (crecimiento, embarazo, lactancia).

Errores congénitos del ciclo de la urea

Se han descripto enfermedades por alteraciones genéticas que afectan la síntesis de enzimas del ciclo de la urea (tabla 16-2). Deficiencias severas de carbamilfosfato sintetasa, ornitina transcarbamilasa, argininosuccinato sintetasa o argininosuccinasa bloquean la síntesis de urea y producen aumentos marcados en la concentración de amoníaco en sangre y tejidos. El defecto relativamente más común es la ausencia de ornitina transcarbamilasa, condición ligada al cromosoma X; los restantes siguen un patrón autosómico recesivo. Como la mayoría de las reacciones del ciclo son irreversibles, puede identificarse la enzima deficiente determinando qué intermediario se encuentra en concentraciones aumentadas en sangre y/o orina.

La falta total de cualquiera de las enzimas del ciclo es incompatible con la vida. Los niños afectados parecen normales al nacimiento, pero a las 24 o 48 horas presentan hipotermia, letargia, apnea. El cuadro es de una encefalopatía, con rápido desenlace fatal.

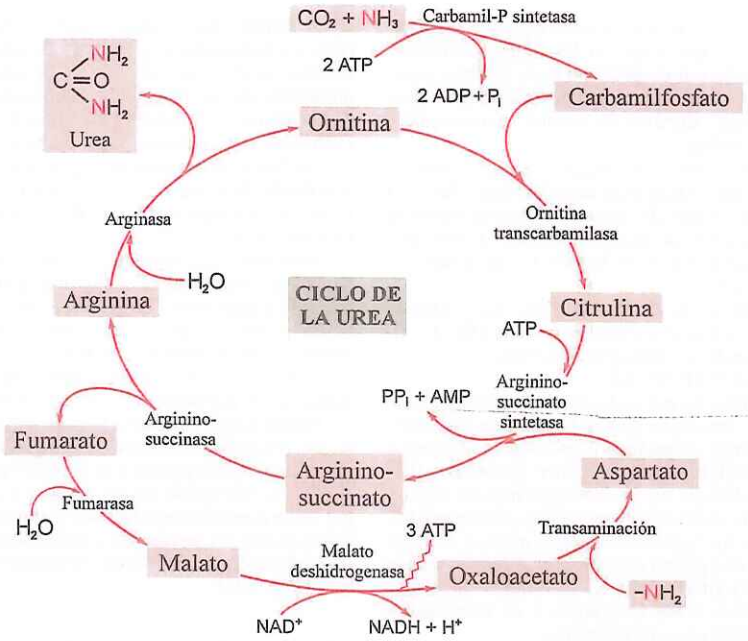


Fig. 16-6. Interrelación de los ciclos de la urea y del ácido cítrico. Los N ingresados al ciclo para integrar finalmente la molécula de urea se representan en rojo.

Las deficiencias parciales de las mismas enzimas pueden no ser letales, pero producen retardo mental y otros trastornos.

En la deficiencia de arginasa, la hiperamoniemia no es tan severa como en los cuadros anteriores. Hay retardo mental progresivo. En las formas más leves de estas enfermedades genéticas, una dieta baja en proteínas contribuye a reducir la amoniemia.

Tabla 16-2. Enfermedades hereditarias relacionadas con el ciclo de la urea.

Enfermedad	*Enzima defectuosa*	*Producto acumulado*
Hiperamoniemia Tipo I	Carbamilfosfato Sintetasa 1	Amoníaco, glutamina y alanina
Hiperamoniemia Tipo II (ligada al X)	Ornitina transcarbamilasa	Amoníaco, glutamina y ácido orótico
Citrulinemia	Argininosuccinato sintetasa	Citrulina
Argininosuccínico aciduria	Argininosuccinato liasa	Arginino succinato
Argininemia	Arginasa	Arginina

Toxicidad del amoníaco

La encefalopatía asociada a defectos severos del ciclo de la urea se debe al aumento de amoníaco en sangre y tejidos. En enfermos con insuficiencia hepática grave también hay hiperamoniemia, principal responsable de la encefalopatía y coma observados en esos pacientes.

Al pH fisiológico, la casi totalidad del amoníaco se convierte en ion amonio (NH_4^+), la relación NH_4^+/NH_3 es de 100/1. El amoníaco, molécula neutra, atraviesa libremente las membranas celulares; el ion amonio no puede hacerlo.

En el cerebro, los niveles normales de amoníaco están alrededor de 0,18 mM; valores de 0,5 mM son patológicos y de 1,0 mM se asocian con convulsiones y coma.

Si bien no se conocen con precisión los mecanismos que determinan la notable toxicidad del amoníaco, probablemente contribuyen todos los que se mencionan a continuación:

1. *Acumulación de glutamina.* La glutamina es un producto importante del metabolismo del amoníaco. Los niveles de esta sustancia en san-

gre, tejidos y líquido cefalorraquídeo se incrementan marcadamente en las hiperamoniemias. La acumulación de glutamina en cerebro, especialmente en astrocitos, produce edema por efecto osmótico, aumento de presión intracraneal e hipoxia cerebral.

2. *Inhibición de la lanzadera malato-aspartato*. La síntesis exagerada de glutamina reduce los niveles de glutamato. Esta disminución inhibe el funcionamiento de la lanzadera malato-aspartato. Se produce aumento de lactato y disminución de pH en cerebro.

3. *Activación de la glucólisis*. El amoníaco estimula la fosfofructoquinasa y con ella la actividad glucolítica. Aumenta el lactato y el valor de la relación NADH/NAD^+.

4. *Inhibición del ciclo de ácido cítrico*. El aumento de amoníaco desvía la reacción catalizada por glutamato deshidrogenasa hacia la aminación de α-cetoglutarato para formar glutamato. Esto produce drenaje de un intermediario del ciclo y deprime la actividad de esta vía de oxidación final.

Todos los factores indicados afectan el metabolismo energético del cerebro. Además, se han observado alteraciones en la función de neurotransmisores y sus receptores y en propiedades electrofisiológicas de neuronas.

Papel de distintos órganos en el metabolismo de aminoácidos

Intestino delgado, hígado, músculo y riñón son los órganos con mayor influencia en el metabolismo de aminoácidos. Referiremos brevemente el principal papel de cada uno.

Intestino. En intestino delgado se absorben aminoácidos procedentes de la digestión de proteínas. De estos aminoácidos el intestino utiliza preferentemente glutamina y asparragina como proveedores de energía. Los productos formados, junto con los restantes aminoácidos de la dieta, son enviados hacia el hígado por la vena porta. Durante períodos de ayuno, el intestino oxida glutamina, liberada a la circulación por el músculo.

Hígado. El catabolismo de aminoácidos, excepto los de cadena ramificada, empieza en hígado. El grupo amina es separado e incorporado a urea. Los esqueletos carbonados pueden ser oxidados hasta CO_2 y H_2O o utilizados para gluconeogénesis y cetogénesis.

El hígado es muy eficiente en la eliminación de amoníaco. Sin embargo, no todos los hepatocitos participan en igual medida en esta función. Las células hepáticas situadas alrededor de vasos del sistema porta (hepatocitos portales), que reciben sangre directamente desde intestino, son ricas en glutaminasa, glutamato deshidrogenasa y todas las enzimas del ciclo de la urea. El NH_3 producido en las reacciones catalizadas por las dos primeras es utilizado para síntesis de carbamilfosfato en la primera etapa del ciclo.

Los hepatocitos localizados próximos a la vena centrolobulillar son ricos en glutamina sintetasa. El NH_3 es principalmente transferido a glutamato para formar glutamina.

Músculo. La degradación de aminoácidos de cadena ramificada se inicia principalmente en músculo esquelético. Los grupos amina son transferidos a piruvato para formar alanina. Más de la mitad de los aminoácidos liberados por músculo a la circulación son alanina y glutamina. Ambos actúan como portadores de amina a otros tejidos.

Riñón. Capta glutamina liberada por el músculo. En reacciones catalizadas por glutaminasa y glutamato deshidrogenasa se produce amoníaco, el cual es convertido en ion amonio y excretado por orina neutralizando aniones. La amoniogénesis es uno de los mecanismos utilizados por riñón en su función de contribuir al equilibrio ácido-base (pág. 628).

Destino del esqueleto carbonado de los aminoácidos

Estudios con isótopos radiactivos refirmaron el concepto de interconvertibilidad de los carbonos de carbohidratos, grasas y proteínas. En animales diabéticos con balance nitrogenado negativo, la administración de determinados aminoácidos incrementa la excreción de glucosa por orina, mientras otros aminoácidos producen aumento de cuerpos cetónicos. Esta observación permitió clasificar los aminoácidos en *glucogénicos* y *cetogénicos*. Casi todos los aminoácidos no esenciales son glucogénicos, lo cual indica que la conversión de estos aminoácidos en glucosa es un proceso reversible, es decir, se pueden sintetizar sus esqueletos carbonados a partir de intermediarios del metabolismo de glucosa.

Por otro lado, casi todos los aminoácidos cetogénicos son indispensables. Pueden ser convertidos en cuerpos cetónicos, pero éstos no sirven como precursores de aminoácidos.

Aminoácidos glucogénicos. Alanina, arginina, aspartato, cisteína, glicocola, glutamato, histidina, hidroxiprolina, prolina, metionina, serina, treonina y valina son glucogénicos. El catabolismo de estos aminoácidos genera alguno de los siguientes intermediarios: piruvato, oxaloacetato, fumarato, succinil-CoA o α-cetoglutarato.

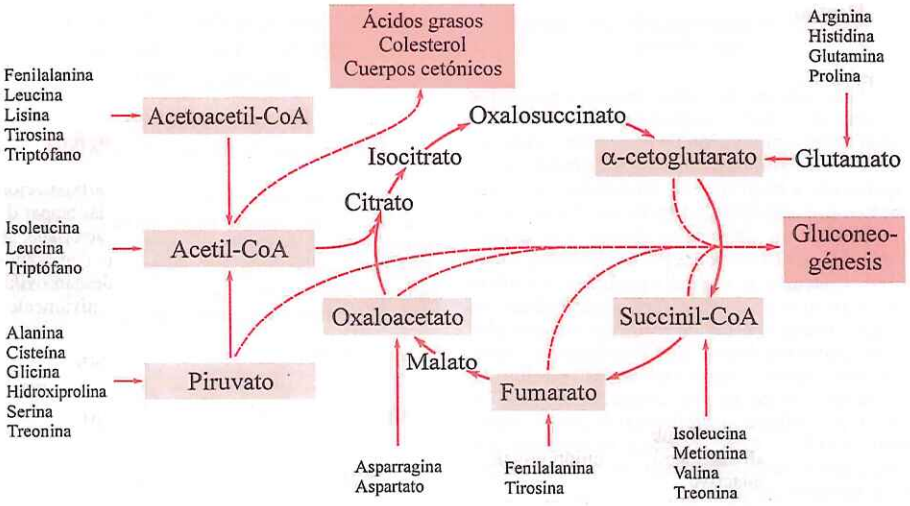


Fig. 16-7. Destino de la cadena carbonada de aminoácidos

Aminoácidos cetogénicos. Leucina y lisina.

Aminoácidos glucogénicos y cetogénicos. La degradación de fenilalanina, isoleucina, tirosina y triptófano.

La figura 16-7 resume los destinos de aminoácidos y su relación con el ciclo del ácido cítrico.

Metabolitos intermedios formados en el catabolismo de aminoácidos

Las vías degradativas de las cadenas carbonadas de aminoácidos desaminados varían según la naturaleza de esas cadenas. Se forman productos intermediarios relacionados con vías metabólicas de hidratos de carbono o ácidos grasos. A continuación se indican metabolitos intermedios y los aminoácidos a partir de los cuales pueden generarse.

Oxaloacetato. Formado a partir de aspartato y su amida, asparragina. La asparragina es hidrolizada por asparraginasa en aspartato y amoníaco. El aspartato, por transaminación, se convierte en oxaloacetato, intermediario del ciclo del ácido cítrico.

Alfa-cetoglutarato. Por diferentes vías, arginina, histidina, prolina e hidroxiprolina se convierten en glutamato. El glutamato, por transaminación o desaminación oxidativa, forma α-cetoglutarato, intermediario del ciclo del ácido cítrico.

Succinil-CoA. Metionina, isoleucina y valina.

Piruvato. Alanina, serina y cisteína forman piruvato. La glicina también forma piruvato, pero debe convertirse primero en serina. La treonina pierde los carbonos β y γ para dar acetil-CoA; el resto forma glicina, que contribuye a formar piruvato, previa transformación en serina.

Acetil-CoA. Todos los aminoácidos convertibles en piruvato, en condiciones de alimentación más o menos adecuada, dan acetil-CoA que se oxida a CO_2 y H_2O cuando el ciclo del ácido cítrico funciona normalmente (el piruvato, además de formar acetil-CoA, alimenta el ciclo gracias a la reacción anaplerótica de piruvato a oxaloacetato). Durante el ayuno prolongado, el piruvato derivado de aminoácidos, en vez de formar acetil-CoA es utilizado en gluconeogénesis. Fenilalanina, tirosina, triptófano, leucina y lisina, no pasan previamente por piruvato; pero dan acetil-CoA, que en condiciones de ayuno o pobre metabolización de carbohidratos, genera acetoacetato, uno de los cuerpos cetónicos.

Fumarato. Fenilalanina y tirosina dan, además de acetoacetato, un intermediario del ciclo del ácido cítrico, fumarato. Por esta razón, estos aminoácidos son a la vez gluco- y cetogénicos.

Catabolismo final. Los intermediarios señalados continúan su degradación total a CO_2 y H_2O en el ciclo del ácido cítrico. El piruvato e intermediarios del ciclo pueden recorrer el camino de la gluconeogénesis para formar glucosa o glucógeno. El acetil-CoA tiene numerosas posibilidades metabólicas, entre ellas, síntesis de ácidos grasos.

Destino de aminoácidos de cadena ramificada

El catabolismo de valina, leucina e isoleucina empieza en músculo esquelético, donde la actividad de transaminación de esos aminoácidos es elevada. Los grupos amina son transferidos principalmente a piruvato con producción de alanina. Los α-cetoácidos generados se utilizan como combustible en músculo e hígado; son descarboxilados oxidativamente por la *deshidrogenasa de α-cetoácidos de cadena ramificada*, complejo multienzimático de estructura y mecanismo de acción similares a los de piruvato y α-cetoglutarato deshidrogenasas. Está localizado en mitocondrias; requiere cinco coenzimas (pirofosfato de tiamina, ácido lipoico, coenzima A, NAD y FAD), es inhibido alostéricamente por producto final, NADH y CoA. También es regulado por fosforilación-desfosforilación; la unión covalente de fosfasto lo inactiva.

Cada uno de los acil-CoA resultantes de la reacción es degradado independientemente por oxidación. El acil-CoA procedente de valina da propionil-CoA, el de leucina, acetoacetil-CoA y el de isoleucina, propionil-CoA y acetil-CoA. El propionil-CoA es metilado a metilmalonil-CoA, reacción catalizada por *metilmalonil-CoA* mutasa, dependiente de vitamina B_{12}. Se produce una redistribución de átomos en la molécula y se forma succinil-CoA, intermediario del ciclo del ácido cítrico.

Defectos genéticos que afectan la síntesis de enzimas del complejo deshidrogenasa de α-cetoácidos de cadena ramificada son la causa de la *enfermedad de orina de jarabe de arce* (*maple syrup urine disease*). La orina de estos pacientes tiene olor a azúcar quemado. Se produce daño cerebral; en los casos severos, la muerte ocurre antes del primer año de vida. Se hereda como carácter autosómico recesivo; ocurre en 1 de cada 185.000 nacimientos.

Alteraciones genéticas de la síntesis de propionil-CoA carboxilasa y metilmalonil-CoA mutasa producen acidosis metabólica, con excreción de ácidos orgánicos por orina (*aciduria orgánica*).

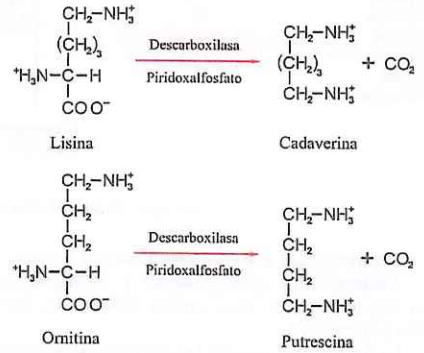
Biosíntesis de aminoácidos

El ser humano no tiene capacidad para sintetizar los aminoácidos esenciales o indispensables. Los restantes se producen en el organismo. En términos generales, si puede biosintetizarse el α-cetoácido correspondiente está asegurada la producción del aminoácido por transaminación.

OTROS MECANISMOS GENERALES DEL METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS

Descarboxilación. Biosíntesis de aminas biológicas

Algunas bacterias producen descarboxilación de aminoácidos. La reacción es una de las etapas de putrefacción de proteínas por acción bacteriana; se producen *aminas biógenas*, sustancias con actividad fisiológica. Lisina y ornitina, por descarboxilación, dan cadaverina y putrescina respectivamente.



En tejidos animales también existen enzimas que catalizan la descarboxilación de aminoácidos. El piridoxal fosfato es la coenzima utilizada por estas descarboxilasas.

Muchas de las aminas biológicas formadas por descarboxilación de aminoácidos son sustancias de importancia funcional.

Histamina. Se produce por descarboxilación de histidina (fig. 16-8). La reacción es catalizada por *histidina descarboxilasa* y por una descarboxilasa de aminoácidos aromáticos que también

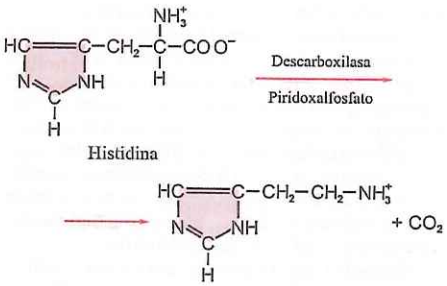


Fig. 16-8. Descarboxilación de histidina.

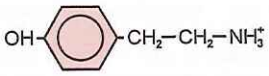
utiliza fenilalanina, tirosina y triptófano como sustratos. Ambas enzimas requieren piridoxalfosfato como coenzima.

La histamina es un amina biógena de gran actividad fisiológica; es mensajero químico en numerosas respuestas celulares. Tiene acción vasodilatadora, disminuye la presión sanguínea; en grandes dosis puede provocar colapso vascular. Produce constricción de bronquiolos, estimula la secreción de ácido clorhídrico y pepsina en estómago.

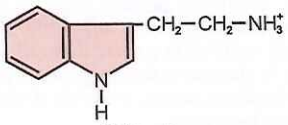
Es almacenada en células cebadas, de donde es liberada bruscamente en respuesta al ingreso a los tejidos de agentes sensibilizantes que provocan reacciones alérgicas e inflamatorias de distinto tipo. Algunos de los llamados antihistamínicos utilizados para tratar reacciones alérgicas son sustancias de estructura química análoga a histamina y se comportan como antagonistas.

Dada la intensa actividad de histamina, el organismo debe degradarla rápidamente una vez producida. A esos efectos existe una enzima, *histaminasa*, que cataliza la oxidación de histamina y la convierte en un producto inactivo.

Tiramina. Triptamina. La descarboxilación de tirosina produce tiramina; la de triptófano, triptamina. Ambas aminas biógenas tienen acción vasoconstrictora.

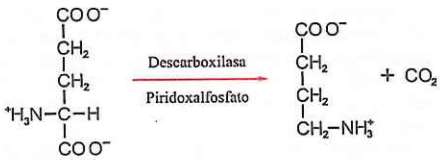


Tiramina



Triptamina

Ácido γ-aminobutírico. Se forma por descarboxilación del ácido glutámico. La enzima que cataliza esta reacción se encuentra preferentemente en sustancia gris de sistema nervioso central; requiere piridoxalfosfato.

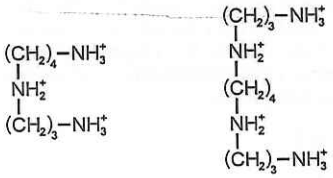


Glutamato γ-aminobutirato

El ácido γ-aminobutírico (GABA, siglas del nombre en inglés) es un compuesto funcionalmente muy importante. Es intermediario químico regulador de la actividad neuronal. Actúa como inhibidor o depresor de la transmisión del impulso nervioso.

La enfermedad de Huntington es una condición hereditaria, progresiva y fatal. Sus síntomas más llamativos son movimientos bruscos, involuntarios (corea). Los pacientes sufren degeneración de neuronas gabaérgicas y niveles disminuidos de GABA.

Poliaminas. La ornitina genera putrescina por descarboxilación. Este compuesto reacciona con metionina descarboxilada para formar las poliaminas *espermidina* y *espermina*.



Espermidina Espermina

Son particularmente abundantes en células con gran actividad mitótica. Su carácter de policationes les permite asociarse con moléculas polianiónicas, como ácidos nucleicos, e influir sobre su actividad. Interaccionan con fosfatos de la doble hélice de ADN o de regiones de doble hebra de ARN. El bacteriófago T4, por ejemplo, tiene cerca del 40% de las cargas negativas de su ADN neutralizado por poliaminas. El ARN de transferencia en algunas especies se une a espermidina y espermina. Hay proteínas que contienen poliaminas unidas covalentemente al carboxilo de restos glutamato.

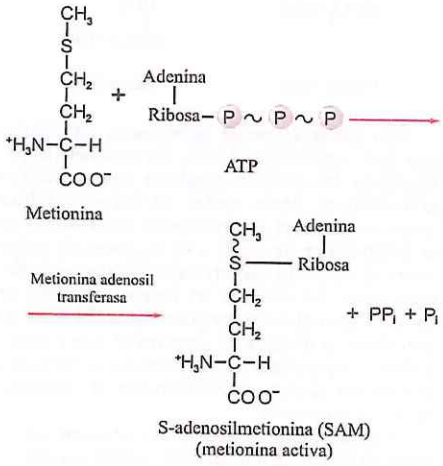
Es posible que las poliaminas desempeñen un papel en la regulación del ciclo celular. La difluorometilornitina, inhibidor de la ornitina descarboxilasa, detiene la progresión del ciclo.

Transferencia de restos monocarbonados

Así como en la transaminación los aminoácidos ceden el grupo funcional amina a una molécula aceptora, algunos aminoácidos también participan en reacciones en las cuales se transfieren otros grupos utilizados en síntesis de sustancias de importancia funcional. Por ejemplo, el grupo amidina de arginina, o amida de glutamina y asparragina, son empleados en la síntesis de diversos compuestos.

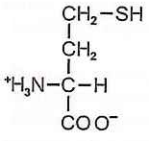
Los grupos monocarbonados forman un conjunto importante de "fragmentos moleculares" frecuentemente transferidos en procesos de síntesis de estructuras químicas más o menos complejas. Presentan distinto grado de oxidación, como metilo ($-CH_3$), hidroximetilo ($-CH_2OH$), formilo ($-CO.H$) y dióxido de carbono (CO_2). Este último también es considerado un "resto" monocarbonado.

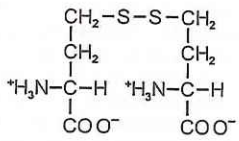
El principal donante de metilo es la *metionina*; su grupo metilo es utilizado en la síntesis de numerosas sustancias, como colina, creatina, adrenalina, carnitina, ARN metilado. Ello es posible únicamente si la metionina está "activada", para lo cual debe reaccionar con ATP y formar S-adenosil metionina (SAM). El átomo de azufre de la metionina se une al C 5' de adenosina. Dos de los grupos fosfato del ATP se liberan como pirofosfato, y el tercero como fosfato inorgánico.



La S-adenosil metionina (SAM) es la forma activa de metionina. La unión entre metilo y azufre es de alta energía, lo cual explica la capacidad del grupo metilo para intervenir en transferencias. Las reacciones en las cuales S-adenosil metionina transfiere grupos metilos para formar distintos compuestos son catalizadas por *metiltransferasas* específicas en cada caso.

Homocisteína. Un producto de estas transmetilaciones es la S-adenosil-homocisteína, que se hidroliza a adenosina y homocisteína. A partir de este compuesto se sintetizan cisteína o metionina. Existen defectos genéticos que producen alteraciones del metabolismo de la homocisteína (homocistinuria y cistationuria).


Homocisteína


Homocistina

El aumento de homocisteína en plasma se observa en deficiencias de vitaminas B_{12} y ácido fólico. La hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo de aterosclerosis en vasos coronarios, cerebrales y periféricos.

Otro agente de transporte de restos de un carbono [metilo, metileno ($-CH_2-$), metenilo ($=CH-$) y formilo] es el *ácido tetrahidrofólico* (THF), derivado de ácido fólico, vitamina del complejo B. La *metilcobalamina*, relacionada con vitamina B_{12}, es otro factor necesario en reacciones de transferencia de restos monocarbonados. La mayoría de estos grupos son cedidos a THF por intermediarios de la degradación de los aminoácidos serina, glicina, histidina y triptófano y son transferidos para síntesis de purinas, timina y metionina.

El dióxido de carbono (CO_2) producido en el ciclo del ácido cítrico o por descarboxilación de aminoácidos es transferido en reacciones catalizadas por *carboxilasas*. La coenzima es la *biotina*, vitamina del complejo B. Las carboxilaciones requieren ATP y forman intermediarios metabólicos de importancia. Las tres principales carboxilasas que usan biotina son: *piruvato carboxilasa*, cataliza la primera etapa de gluconeogénesis (también reacción anaplerótica del ciclo de Krebs), *acetil-CoA carboxilasa*, primera etapa en la vía de síntesis de ácidos grasos, y *propionil-CoA carboxilasa*, enzima clave en el catabolismo de valina e isoleucina.

Ácido fólico, vitamina B_{12} y biotina son considerados más extensamente en págs. 599 a 605.

VÍAS METABÓLICAS DE AMINOÁCIDOS

Además de los procesos metabólicos generales mencionados, cada aminoácido sigue vías específicas y da origen a diferentes productos. El estudio de todas esas vías convierte al capítulo del metabolismo de aminoácidos en el más extenso y complejo dentro del estudio de las transformaciones bioquímicas. No es propósito de este texto realizar un análisis exhaustivo del tema. La presentación de algunos ejemplos ser-

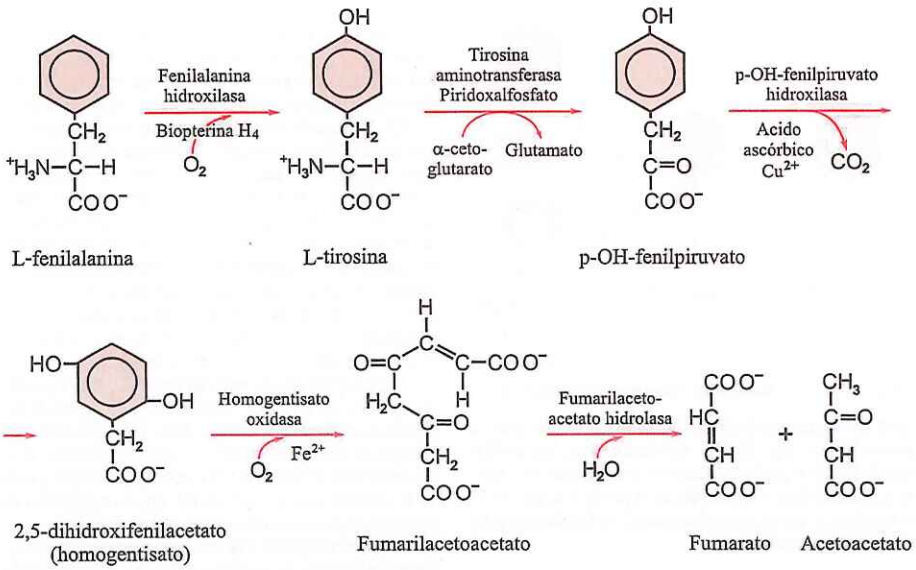


Fig. 16-9. Catabolismo de fenilalanina y tirosina.

virá para dar idea de la multiplicidad de posibilidades metabólicas.

Metabolismo de fenilalanina y tirosina

Debido a su parentesco estructural, estos aminoácidos se consideran conjuntamente.

El organismo humano no tiene capacidad para sintetizar el anillo bencénico; los aminoácidos fenilalanina y tirosina son la principal fuente alimentaria de este núcleo químico.

La fenilalanina es convertida en tirosina, especialmente en hígado. No existen enzimas para catalizar la reacción inversa, es decir formación de fenilalanina a partir de tirosina. Por esta razón, la fenilalanina es un aminoácido esencial y la tirosina no lo es mientras haya provisión adecuada de fenilalanina.

La vía catabólica de estos aminoácidos conduce a la formación de fumarato y acetoacetato, intermediarios relacionados con el metabolismo de carbohidratos y ácidos grasos respectivamente. Por esta razón, fenilalanina y tirosina son a la vez gluco- y cetogénicos.

La serie de reacciones se representa en la figura 16-9. La primera etapa es la conversión de fenilalanina en tirosina, reacción catalizada por un sistema compuesto por dos enzimas, *fenilalanina hidroxilasa* y *dihidrobiopterina reductasa*, que introducen un hidroxilo en posición *para* del anillo bencénico. Se requiere oxígeno molecular y una coenzima que cede el hidrógeno, *tetrahidrobiopterina* (THB). La reacción es irreversible. La dihidrobiopterina reductasa regenera THB a partir de dihidrobiopterina y NADPH.

En la segunda etapa se produce transaminación; se origina el α-cetoácido correspondiente a la tirosina, ácido p-hidroxifenilpirúvico.

El tercer paso es una compleja reacción en la cual se produce oxidación, desplazamiento de la cadena lateral a otra posición en el anillo bencénico y descarboxilación, para formar ácido homogentísico. Este compuesto se oxida a maleilacetoacetato (no representado en la secuencia de la fig. 16-12), que se isomeriza a fumaril-acetoacetato.

Finalmente, el fumaril-acetoacetato es hidrolizado a fumarato y acetoacetato. El fumarato es intermediario del ciclo del ácido cítrico, mientras el acetoacetato es un cuerpo cetónico. Ambos pueden ser oxidados a anhídrido carbónico y agua.

Todas las enzimas involucradas en esta vía se encuentran en hígado.

La mayor parte del catabolismo de la fenilalanina sigue el camino descripto. Sin embargo, existe una vía alternativa, de menor cuantía, que se inicia con transaminación para dar ácido fenilpirúvico, el

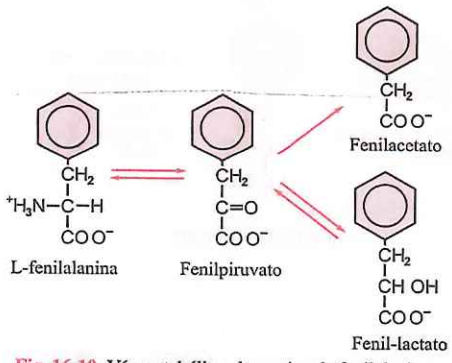


Fig. 16-10. Vía metabólica alternativa de fenilalanina.

cual es descarboxilado a fenilacético o reducido a fenil-láctico (fig. 16-10). Normalmente, los ácidos fenil-láctico y fenilpirúvico son convertidos de vuelta a fenilalanina y metabolizados por la vía que lleva a tirosina y ácido homogentísico. El fenilacetato es excretado por orina.

Biosíntesis de catecolaminas

Otra vía metabólica de fenilalanina y tirosina produce sustancias de gran actividad fisiológica, las catecolaminas dopamina, noradrenalina y adrenalina. Estos compuestos se sintetizan en células cromafines, así llamadas porque contienen gránulos que adquieren color rojo pardusco con dicromato de potasio. La síntesis de catecolaminas sigue las mismas etapas en el sistema nervioso que en la médula adrenal.

La secuencia de reacciones a partir de tirosina es la siguiente.

1. **Formación de DOPA.** Por acción de *tirosina hidroxilasa* se introduce un segundo grupo hidroxilo en el anillo bencénico para formar 3,4-dihidroxifenilalanina, también designada con las siglas DOPA. La reacción requiere oxígeno y tetrahidrobiopterina (THB). Para mantener el nivel de THB es necesaria la presencia de dihidrobiopterina reductasa y NADPH.

La tirosina hidroxilasa es una enzima regulatoria. Es inhibida por dopamina y noradrenalina y activada por fosforilación dependiente de AMP cíclico.

2. **Formación de dopamina.** *DOPA descarboxilasa*, con piridoxalfosfato como coenzima, cataliza la formación de esta amina biógena, una de las catecolaminas. La enzima tiene amplia especificidad de sustrato, actúa sobre aminoácidos aromáticos y derivados. La dopamina es muy activa; es un neurotransmisor o intermediario químico en el sistema nervioso. En algunas células del sistema nervioso central, la vía termina en dopamina. En otras, continúa con la etapa siguiente.

El contenido de dopamina en centros nerviosos como núcleo caudado, putamen y pallidum es muy reducido en pacientes con mal de Parkinson. Este hallazgo, de gran interés clínico y farmacológico, tuvo inmediata aplicación. La administración de DOPA en elevadas dosis es un recurso eficaz, utilizado en el tratamiento de esta enfermedad. El compuesto pasa desde la sangre hacia los centros nerviosos, donde es convertido en dopamina. Como la dopamina no atraviesa la "barrera hematoencefálica", debe utilizarse un precursor difusible.

3. **Formación de noradrenalina.** La dopamina es hidroxilada por acción de *dopamina-β-hidroxilasa* y forma noradrenalina, también llamada norepinefrina. Se requiere oxígeno molecular, ácido ascórbico (vitamina C) y cobre. La mayor parte de la noradrenalina sintetizada en el organismo se produce en nervios del sistema simpático.

4. **Formación de adrenalina o epinefrina.** Por transmetilación, la noradrenalina es transformada en adrenalina, también llamada epinefrina. La reacción, catalizada por *feniletanolamina-N-metiltransferasa* (PNMT), requiere S-adenosil metionina como dador de metilo. La enzima se encuentra en médula adrenal. La adrenalina es la principal catecolamina sintetizada en esta glándula.

La síntesis de PNMT es inducida por cortisol, hormona de la corteza adrenal.

La figura 16-11 resume la serie de reacciones.

Las catecolaminas actúan como transmisores químicos del sistema adrenérgico. Su acción es variada: vasoconstrictora en algunos territorios vasculares, vasodilatadora en otros. Aumentan la frecuencia cardíaca y el volumen minuto, tienen efecto relajante sobre musculatura bronquial, estimulan la glucogenólisis en músculo y la lipólisis en tejido adiposo. El tipo de respuesta depende de los receptores adrenérgicos existentes en los órganos efectores. Los receptores α participan en procesos de vasoconstricción periférica, mientras los receptores β están asociados a vasodilatación en algunas áreas y estimulación cardíaca. La noradrenalina posee principalmente acciones sobre receptores α, por esto predomina la acción vasopresora. La adrenalina tiene efecto sobre ambos tipos de receptores.

Existen tumores de tejido cromafín, llamados *feocromocitomas*, que secretan gran cantidad de catecolaminas. Los pacientes presentan hipertensión arterial severa.

Como toda sustancia de gran actividad biológica, las catecolaminas son rápidamente degradadas y eliminadas del organismo; su vida media es de 15

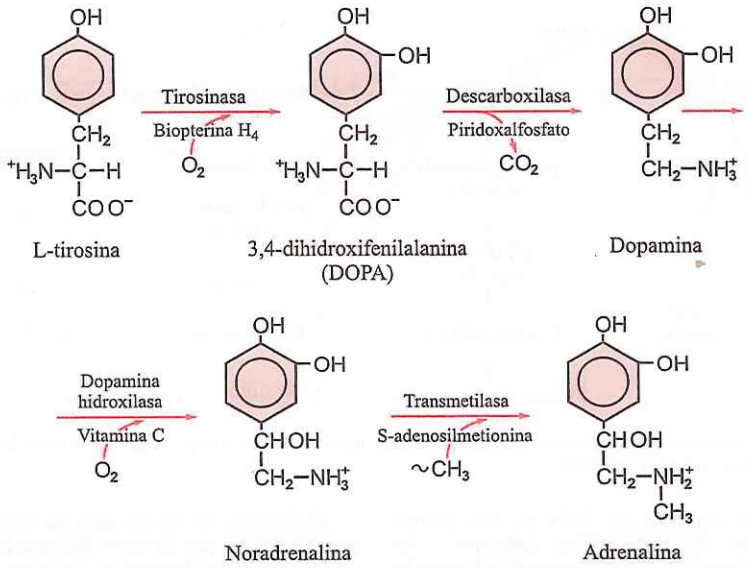


Fig. 16-11. Biosíntesis de catecolaminas.

a 30 segundos. El proceso de inactivación se debe principalmente a la acción de *monoamino oxidasa* (MAO) y *catecol-O-metil transferasa* (COMT). La monoamino oxidasa (MAO) es responsable de la desaminación oxidativa de catecolaminas y otras aminas biológicas, como tiramina, triptamina y serotonina. La catecol-O-metil transferasa (COMT) cataliza la metilación de uno de los grupos hidroxilo de catecolaminas, por lo general, el OH unido al anillo bencénico en posición meta.

En la sección dedicada a hormonas de médula suprarrenal se dan más detalles sobre las vías de inactivación de catecolaminas (pág. 535).

Se conocen muchas sustancias inhibidoras de MAO. Su administración produce aumento de concentración de catecolaminas en sistema nervioso; esta acción tiene efectos estimulantes. Algunos de estos fármacos son utilizados en el tratamiento de depresiones nerviosas. La reserpina, en cambio, es una droga de efectos opuestos a los inhibidores de MAO; determina reducción de los depósitos de adrenalina acumulada en terminaciones nerviosas.

Síntesis de melanina

El pigmento que da color a la piel y al pelo es derivado de tirosina, la cual, previa conversión en DOPA, sufre una serie de transformaciones que llevan a producir melanina.

La hidroxilación de tirosina a DOPA en melanocitos es catalizada por *tirosinasa*, enzima que contiene cobre, distinta de la tirosina hidroxilasa de la vía de síntesis de catecolaminas en sistema nervioso y médula adrenal.

La misma tirosinasa promueve la oxidación de DOPA a DOPAquinona, que después de una serie de oxidaciones no enzimáticas se polimeriza para formar pigmentos de color marrón y negro.

Síntesis de hormona tiroidea

Tiroxina y triiodotironina, hormonas de la glándula tiroides, se sintetizan a partir de tirosina. La vía correspondiente se considera en página 522.

Errores congénitos del metabolismo de tirosina y fenilalanina

Se han descripto varias enfermedades genéticas relacionadas con el metabolismo de estos aminoácidos. Se mencionarán sólo las más comunes.

Fenilcetonuria u oligofrenia fenilpirúvica. Esta enfermedad hereditaria se debe a incapacidad para convertir fenilalanina en tirosina, que

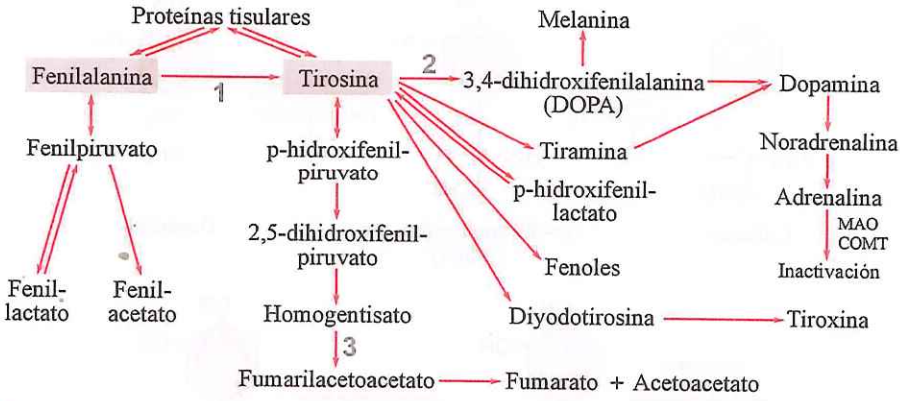


Fig. 16-12. Resumen de vías metabólicas de fenilalanina y tirosina. 1 indica la etapa bloqueada en la fenilcetonuria, 2 en el albinismo y 3 en alcaptonuria.

puede ser causada por falta de fenilalanina hidroxilasa, dihidrobiopterina reductasa o tetrahidrobiopterina. En estos pacientes la tirosina resulta ser un aminoácido esencial; su metabolización no está afectada.

La fenilalanina, que no puede seguir la vía principal de degradación, es derivada a vías alternativas y forma fenilpiruvato, fenil-lactato y fenilacetato (fig. 16-10 y 16-12). La fenilalanina y estos intermediarios se acumulan en tejidos y sangre y se excretan por orina.

Este defecto ocurre con una frecuencia de un caso cada 10.000 nacimientos.

En niños afectados de esta enfermedad se producen alteraciones en sistema nervioso central y marcado retardo mental. La administración de una dieta pobre en fenilalanina a edad suficientemente temprana previene los defectos mentales. De aquí la necesidad de un diagnóstico precoz. Debe investigarse sistemáticamente la presencia de ácido fenilpirúvico en orina de recién nacidos. Un índice más seguro es el nivel de fenilalanina en plasma sanguíneo.

Alcaptonuria. En esta enfermedad hay incapacidad para metabolizar completamente fenilalanina y tirosina. El defecto metabólico se debe a falta de homogentisato oxidasa. Se produce aumento de ácido homogentísico, que se elimina por orina. Esta sustancia, por oxidación, se convierte en un pigmento marrón negruzco llamado alcaptona. El ennegrecimiento de la orina expuesta al aire es precisamente el síntoma más llamativo de la enfermedad. En pacientes adultos puede producirse pigmentación generalizada del tejido conectivo y artritis.

Albinismo. Es un trastorno de origen genético, producido por distintos defectos heredados que afectan la producción de melanina. Algunas formas de albinismo se deben a falta de tirosinasa. Estos pacientes no pueden sintetizar melanina; carecen de pigmentación en piel y cabello, tienen gran sensibilidad a la radiación solar y tendencia a carcinomas de piel.

Metabolismo de triptófano

Sólo mencionaremos algunas vías de especial interés.

Biosíntesis de serotonina

Una de las vías del aminoácido triptófano comprende hidroxilación en carbono 5 para formar 5-hidroxitriptófano, reacción catalizada por triptófano *hidroxilasa*, que requiere oxígeno y tetrahidrobiopterina (THB). En una segunda etapa, el compuesto es descarboxilado a *5-hidroxitriptamina* (5HT), también llamada *serotonina*, *trombotonina* o *trombocitina* (fig. 16-13). Este compuesto se sintetiza y almacena en células de cerebro e intestino. Las plaquetas la captan del plasma sanguíneo.

La serotonina actúa como neurotransmisor y ejerce múltiples funciones regulatorias en el sistema nervioso; se ha propuesto su participación en mecanismos tales como el sueño, apetito, termorregulación, percepción del dolor y control de las secreciones de la hipófisis anterior. La 5HT debe ser producida en el mismo cerebro, pues no atraviesa

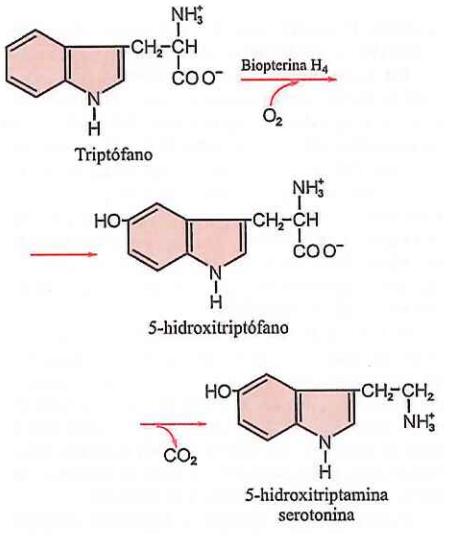


Fig. 16-13. Biosíntesis de serotonina

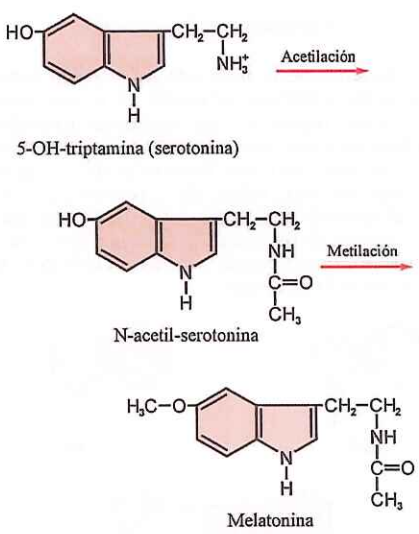


Fig. 16-14. Biosíntesis de melanotonina.

la barrera hematoencefálica. La disminución de los niveles de serotonina en sistema nervioso central tiene efecto depresor de la actividad cerebral.

La 5HT es además estimulante de la contracción de músculo liso; es un poderoso vasoconstrictor.

Existe un tipo de neoplasias generadas por transformación maligna de células enterocromafines que sintetizan serotonina (argentafinomas); entre otros síntomas, producen diarrea y cólicos intestinales.

La mayor parte de la serotonina liberada es sometida a desaminación oxidativa (*monoamino oxidasa,* MAO) para dar 5-OH-indolacético, compuesto inactivo. Los inhibidores de la MAO producen estimulación psíquica porque prolongan la acción de serotonina.

La dietilamina del ácido lisérgico (LSD) compite con la serotonina; la intoxicación con LSD puede ser tratada con administración de serotonina.

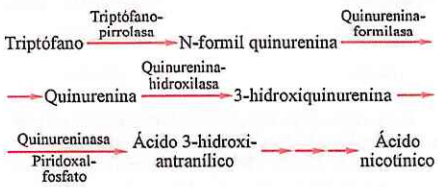
Síntesis de melatonina

La melatonina es una hormona derivada de glándula pineal y de nervios periféricos en el hombre. Bloquea la acción de hormona melanocito estimulante y de adrenocorticotrofina. Se forma a partir de triptófano, el cual debe convertirse primero en serotonina. Esta es acetilada y luego metilada (fig. 16-14).

La síntesis de melatonina es regulada por el ciclo diario de luz-oscuridad. La hormona está íntimamente relacionada con la producción de los ritmos circadianos observados en muchas variables fisiológicas. También está comprometida en funciones de reproducción.

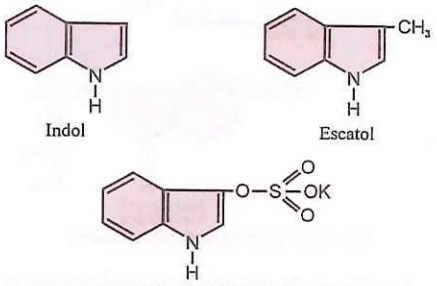
Síntesis de ácido nicotínico

El ácido nicotínico es una vitamina del complejo B; un derivado, la nicotinamida, integra la molécula de las coenzimas NAD y NADP. La falta de esta vitamina en la dieta produce un cuadro muy grave, la pelagra (pág. 592). El consumo de alimentos con proteínas ricas en triptófano mejora los síntomas de pelagra, aun cuando no se suministre ácido nicotínico. Esto se explica porque el ácido nicotínico es producido en una de las vías metabólicas del triptófano:



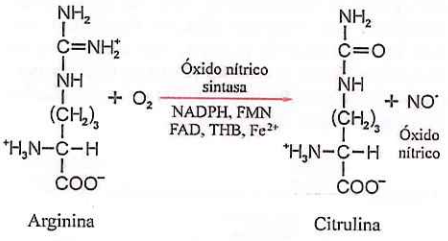
Putrefacción bacteriana

Bacterias de la flora intestinal actúan sobre los restos triptófano existentes en el contenido del tracto digestivo. Las sustancias formadas pueden ser excretadas con las heces o absorbidas y eliminadas por orina. Entre estas sustancias se encuentran indol, indolacético, escatol e indoxilo. El indoxilo conjugado con sulfato se encuentra en orina de personas con alimentación rica en proteínas. La sal potásica de indoxil sulfato es el llamado *indicán urinario*.



Síntesis de óxido nítrico

El óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) es un gas generado a partir de arginina en reacción catalizada por *óxido nítrico sintasa* (ONS). Participan las coenzimas NADPH, FMN, FAD y tetrahidrobiopterina (THB). La enzima contiene Fe^{2+} hemínico y es activada por el complejo Ca^{2+}-calmodulina. Se producen óxido nítrico y citrulina.



Para regenerar tetrahidrobiopterina se requiere *dihidrobiopterina reductasa* y NADPH.

El óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) es un radical libre de gran reactividad química. Por esta razón tiene una vida media muy efímera, menor de 5 segundos. Gracias a su pequeñez, difunde rápidamente a través de membranas. El $NO^{\cdot}$ es un importante regulador y "mensajero" de múltiples funciones.

En mamíferos se han reconocido tres isozimas de óxido nítrico sintasa, con distribución celular y propiedades regulatorias diferentes. Una se encuentra en células endoteliales de vasos sanguíneos (NOS*e* o I), otra en macrófagos (NOS*i* o II) y una tercera en neuronas (NOS*n* o III). Si bien esta localización indica las células con mayor riqueza enzimática, también se ha encontrado actividad NOS en otros tejidos. Las isozimas I y III son constitutivas. La enzima de macrófagos (NOS i o II) es inducible.

$NO^{\cdot}$ es el *factor de relajación vascular derivado de endotelio* descripto antes de conocerse su naturaleza química. Participa como mensajero de un sistema de señales, uno de cuyos eslabones es la guanilato ciclasa (pág. 494). Como efecto final se produce vasodilatación en distintas áreas vasculares, entre ellas los cuerpos cavernosos del pene; su acción contribuye a la erección.

Durante mucho tiempo se utilizaron nitroglicerina y nitratos orgánicos como vasodilatadores en el tratamiento de la enfermedad coronaria. Hoy se sabe que esos compuestos actúan por liberación de $NO^{\cdot}$.

El óxido nítrico es producido por neuronas en distintos sectores del cerebro. Si bien es un neurotransmisor muy atípico, hay evidencias de su participación en importantes funciones del sistema nervioso.

En macrófagos, la óxido nítrico sintasa es inducida por estímulos y factores liberados en focos inflamatorios o ante la entrada de agentes extraños. La brusca liberación de $NO^{\cdot}$ genera radicales libres con acción tóxica sobre bacterias, células tumorales y otros materiales fagocitados.

Utilización de aminoácidos en reacciones de desintoxicación

Algunos aminoácidos, o sustancias derivadas de ellos, son utilizados en reacciones tendientes a tornar inocuas o a facilitar la eliminación de sustancias tóxicas ingresadas en el organismo.

Por ejemplo, la glicina forma complejos atóxicos con diversas sustancias aromáticas. Con ácido benzoico forma *ácido hipúrico* (hipurato), producto de excreción de esa sustancia por orina (fig. 16-15). La síntesis se realiza principalmente en hígado; la determinación del ácido hipúrico excretado por orina después de administrar benzoato ha sido utilizada como prueba funcional de hígado.

La cisteína participa en reacciones de desintoxicación de compuestos orgánicos. El aminoá-

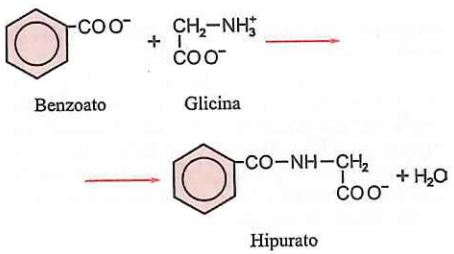


Fig. 16-15. Biosíntesis de ácido hipúrico.

cido es transformado en taurina después de varias etapas metabólicas. La taurina interviene en conjugaciones (para ejemplo, ver formación de taurocolato, pág. 236). El resto cisteína de glutatión es utilizado en la formación de los llamados ácidos mercaptúricos, compuestos solubles, fácilmente eliminados por orina, que resultan de la desintoxicación de compuestos halogenados, organofosforados y otros.

La sulfoconjugación es un proceso de desintoxicación en el cual participa sulfato previamente activado por reacción con ATP. Se forma *adenosina-3'-fosfato-5'-fosfosulfato* o *fosfoadenosina-fosfosulfato* (PAPS) o "sulfato activo", capaz de transferir sulfato a una sustancia aceptora.

Gran parte del sulfato procedente de la oxidación del azufre de cisteína y metionina es eliminado por orina como sulfato inorgánico. Una pequeña parte se encuentra combinada en compuestos orgánicos derivados de fenol, indol, escatol. Anteriormente se ha mencionado el indicán, sal potásica de indoxilsulfato. La cantidad de este compuesto en orina refleja la magnitud de la putrefacción bacteriana en intestino.

Síntesis de creatina

La creatina es una sustancia presente en músculo esquelético, miocardio y cerebro, tanto libre como unida a fosfato (creatinafosfato o fosfocreatina).

Tres aminoácidos, arginina, glicina y metionina, están involucrados en la biosíntesis de creatina. La primera reacción ocurre en riñón; es la unión del resto amidina de arginina a glicina para formar ácido guanidoacético. La síntesis de creatina se completa en el hígado con la metilación del ácido guanidoacético (fig. 16-16). El donante de metilo es S-adenosilmetionina.

Desde el hígado la creatina pasa a la circulación y es captada por músculo esquelético, miocardio y cerebro, donde reacciona con ATP para formar creatinafosfato.

La fosforilación de creatina es catalizada por *creatinafosfato quinasa*, localizada en el espacio intermembrana de mitocondrias.

Isozimas de creatinafosfato quinasa. La enzima es un dímero formado por las asociaciones posibles de subunidades M (de músculo) y B (de *brain*, cerebro), lo que explica la existencia de tres isozimas, MM, MB y BB. La isozima de cerebro es BB, la de músculo esquelético es casi totalmente MM y en corazón hay alrededor de 15% de MB y el resto es MM. La determinación de actividad creatinafosfato quinasa en suero o plasma sanguíneo es útil en el diagnóstico de infarto de miocardio. El nivel de enzima en plasma aumenta 6 a 8 horas después de producido el infarto y llega a un máximo a las 24-48 horas. La detección de isozima MB en plasma certifica que el órgano dañado es corazón.

La creatinafosfato tiene un enlace ~Ⓟ de alta energía. Constituye una reserva energética utilizada para mantener el nivel intracelular de ATP en músculo durante períodos breves de actividad contráctil intensa. La reacción es reversible, cuando se requiere ATP, éste puede generarse a partir de creatinafosfato y ADP.

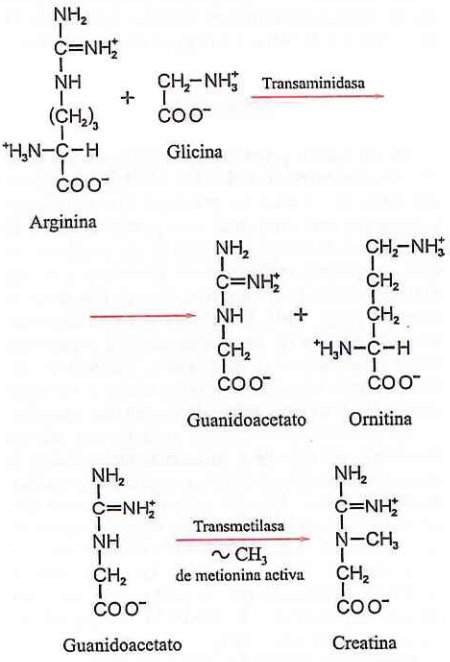
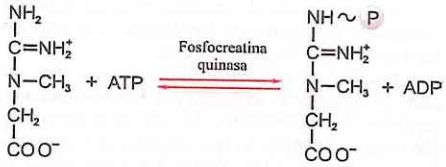
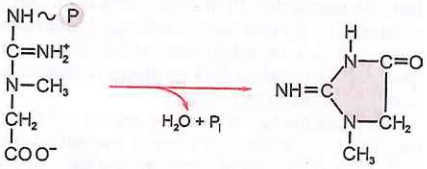


Fig. 16-16. Biosíntesis de creatina.



Creatina — Creatinafosfato

La creatinafosfato es un compuesto inestable, se cicliza espontánea e irreversiblemente para formar *creatinina* y fosfato libre.



Creatinafosfato — Creatinina

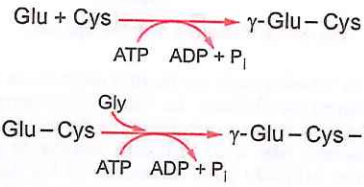
La creatinina se elimina por orina; la cantidad excretada durante 24 horas es relativamente constante en cada individuo y está relacionada con la masa muscular. La concentración normal en plasma de adultos normales es de 0,9 a 1,4 mg por dL en varones y de 0,8 a 1,2 mg por dL en mujeres.

Glutatión

El tripéptido γ-glutamil-cisteinil-glicina (pág. 33) se encuentra en todas las células en concentraciones de ~5 mM. La principal función de este compuesto está vinculada a su poder reductor. El glutatión contribuye a mantener en estado reducido los grupos sulfhidrilo de proteínas y es una defensa contra la acción de especies reactivas de oxígeno (pág. 194). En glóbulos rojos disminuye la formación de metahemoglobina y previene daños oxidativos a la membrana. También es necesario para síntesis de eicosanoides y en reacciones de desintoxicación de sustancias extrañas.

La *glutatión peroxidasa*, enzima con selenio localizada en citosol y mitocondrias, cataliza la reducción de hidroperóxidos orgánicos y peróxido de hidrógeno. En esta reacción se genera glutatión oxidado (GSSG), el cual debe ser reducido para mantener la relación GSH/GSSG dentro del valor normal, próximo a 100. La reducción de GSSG es catalizada por la *glutatión reductasa*, enzima dependiente de NADPH, encargada de regenerar GSH (pág. 194).

Síntesis de glutatión. Comprende dos etapas; en la primera se forma una unión amida entre el carboxilo γ de glutamato y el grupo α-amina de cisteína. La reacción es catalizada por γ-*glutamil-cisteína sintetasa*; la energía necesaria es provista por la hidrólisis de ATP. En el paso siguiente, catalizado por *glutatión sintetasa* y acoplado a la ruptura de ATP a ADP y P_i , se forma una unión peptídica entre el carboxilo del resto cisteína del dipéptido generado en la reacción anterior y el grupo amina de una glicina.



Existen defectos genéticos que reducen la capacidad para sintetizar glutatión (deficiencia de γ-glutamil-cisteína y de glutatión sintetasas). Los cuadros clínicos asociados a estas condiciones hereditarias presentan diversos síntomas, entre ellos anemia hemolítica y anormalidades neurológicas y mentales.

Ciclo del γ-glutamilo. Otra función del glutatión es servir de intermediario en un sistema de transporte de aminoácidos a través de membranas. Se trata de un mecanismo cíclico presente en varios órganos (hígado, riñón, intestino). El proceso es resumido en la figura 16-17. Todos los aminoácidos, excepto la prolina, pueden utilizar este mecanismo para ingresar a las células.

Las etapas del ciclo son las siguientes: en primer lugar, el aminoácido a transportar se une a un sitio específico en la cara externa de la membrana plasmática, donde se encuentra inserta la γ-*glutamil transferasa* o *transpeptidasa*. Esta enzima cataliza la separación del resto γ-glutamilo de glutatión procedente del citosol. El γ-glutamil se une al aminoácido fijado a la membrana. Los productos resultantes de la reacción son dos dipéptidos: γ-glutamil-aminoácido y cisteinil-glicina. Este último es hidrolizado a cisteína y glicina libres por una *dipeptidasa*. El dipéptido γ-glutamil-aminoácido es transferido al interior de la célula y escindido por la γ-*glutamil-ciclotransferasa*. El resultado neto de esta reacción es el ingreso de un aminoácido al citoplasma y liberación de glutamato.

La misma γ-*glutamil-ciclotransferasa* convierte el glutamato en un compuesto cíclico muy estable, 5-oxoprolina, también llamado ácido piroglutámico. A continuación, la 5-oxoprolinasa promueve la conversión de 5-oxoprolina en glutamato. Se requiere energía, provista por hidrólisis de ATP. En las dos etapas restantes se

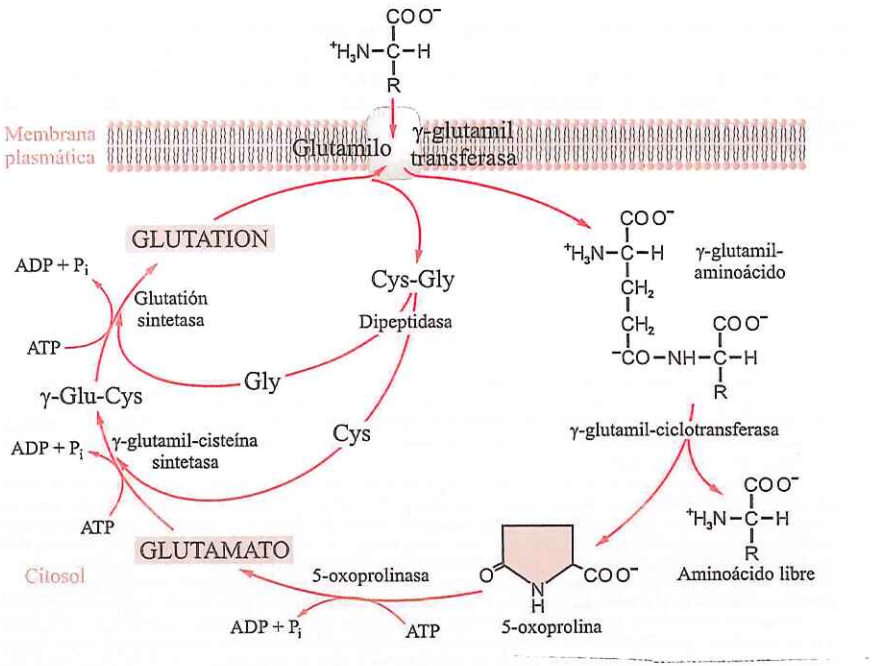


Fig. 16-17. Ciclo de γ-glutamilo.

regenera glutatión en reacciones catalizadas por *γ-glutamil-cisteína sintetasa* y *glutatión sintetasa*, responsables de la síntesis de glutatión.

Excepto la enzima que cataliza la primera etapa del ciclo, que es una proteína integral de membrana, las restantes están localizadas en el citosol.

Este sistema de transporte es energéticamente muy costoso; el ingreso de cada aminoácido demanda el consumo de tres enlaces de alta energía de ATP.

La enzima que cataliza la primera etapa del ciclo, la γ-glutamil transferasa, es determinada con fines diagnósticos en el laboratorio clínico. Su actividad en el plasma sanguíneo aumenta en pacientes con obstrucción biliar, daño hepático por ingestión alcohólica, neoplasias diseminadas, carcinoma de próstata.

Errores congénitos del metabolismo de aminoácidos

Estas enfermedades resultan generalmente de mutaciones que afectan la síntesis de enzimas. A veces el defecto compromete sitios o restos aminoacídicos críticos de la molécula y altera su eficiencia catalítica; otras bloquean por completo la síntesis. Todo defecto que determine pérdida de actividad de una enzima integrante de una vía metabólica causa interrupción del flujo de sustratos y acumulación de los metabolitos intermediarios de etapas previas al sitio afectado. Por lo general, el aumento de la concentración de metabolitos que normalmente se encuentran en niveles muy bajos tiene efectos deletéreos, especialmente para el sistema nervioso central del niño en los primeros períodos de vida. De allí la frecuente producción de retardo mental y trastornos neurológicos en estos pacientes.

En algunos casos es posible reducir los riesgos de daños severos mediante dietas en las cuales se elimina o reduce el aminoácido cuyo metabolismo está afectado. Por ello es imperioso realizar el diagnóstico antes de la producción de daños irreversibles.

En la gran mayoría de los casos, las enfermedades genéticas humanas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos comprenden enzimas de vías catabólicas o de síntesis de productos derivados. En niños bien alimentados no se han descripto deficiencias de aminoácidos no esen-

ciales causadas por alteraciones en sus vías de síntesis.

En el transcurso de este capítulo se han mencionado sólo algunas de las enfermedades hereditarias del metabolismo de aminoácidos. En la actualidad se conoce un gran número de ellas. No está dentro de los propósitos de este libro efectuar una presentación exhaustiva de los errores congénitos; simplemente se destaca la necesidad de conocer la existencia de estos problemas, habida cuenta la importancia que tiene el diagnóstico precoz.

RESUMEN

Los aminoácidos (aa) ingresados con la alimentación se confunden con los procedentes de la degradación de proteínas endógenas y de la síntesis en las células. Todos los aa libres del organismo, cualquiera sea su origen, forman un *pool* o fondo metabólico común. En adultos normales bien alimentados la ingesta de nitrógeno (representado principalmente por el contenido en las proteínas de la dieta) es equilibrada por la excreción en orina y heces; se dice que existe *balance nitrogenado*.

El nivel de cada proteína en la célula resulta del equilibrio entre síntesis y degradación. La vida media de diferentes proteínas varía entre horas y muchos meses. Cumplida la vida útil de una proteína, ésta es hidrolizada en sus aminoácidos constituyentes. Los principales sistemas encargados de esta función son: a) *Lisosomas*. Contienen proteasas llamadas *catepsinas*. b) *Ubicuitina-proteasoma*. La proteína a degradar es "marcada" por inserción de varias unidades de ubicuitina en tándem, catalizada por enzima activante (E1), conjugante (E2) y ligasa (E3). El proteasoma es un cilindro hueco formado por múltiples subunidades; en su superficie interna tiene sitios de actividad proteolítica. La proteína es liberada de la cadena de ubicuitinas e introducida en el proteasoma donde es hidrolizada a oligopéptidos.

Aminoácidos esenciales. Fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptófano y valina no pueden ser sintetizados por células humanas; son aa esenciales o indispensables; deben ser provistos por la dieta. Arginina e histidina son relativamente esenciales. Los aa no utilizados en la síntesis de proteínas o de otros compuestos nitrogenados son degradados con fines energéticos.

Catabolismo de aminoácidos. El grupo amina es separado y sigue caminos metabólicos independientes de los de la cadena carbonada. Los procesos relacionados con el destino del grupo amina son transaminación y desaminación. *Transaminación*: el grupo α-amina es transferido de un aa a un α-cetoácido; reacción catalizada por transaminasas o aminotransferasas que utilizan piridoxal fosfato como coenzima. El piridoxal-P sirve de aceptor y transportador del grupo amina, convirtiéndose reversiblemente en piridoxamina-P. A excepción de lisina y treonina, todos los aa participan en reacciones de transaminación con piruvato, oxaloacetato o α-cetoglutarato para formar alanina, aspartato o glutamato respectivamente y los α-cetoácidos correspondientes a los aa originales. A su vez, alanina y aspartato reaccionan con α-cetoglutarato. En consecuencia, los grupos amina de todos los aa convergen en la formación de glutamato. *Desaminación de glutamato*: catalizada por glutamato deshidrogenasa, utiliza NAD o NADP. Se forman α-cetoglutarato y amoníaco. Al pH de las células, 99% del amoníaco se convierte en ion amonio (NH_4^+).

Vías metabólicas del amoníaco. El NH_3 producido por desaminaciones en los tejidos y también el generado por bacterias de la flora intestinal llega a la sangre y debe ser eliminado porque es tóxico. Uno de los mecanismos de eliminación es la formación de glutamina: el NH_3 se une a glutamato; reacción catalizada por glutamina sintetasa, requiere ATP. La glutamina es hidrolizada a glutamato y NH_3 por glutaminasa. En riñón, la producción de amoníaco es importante como mecanismo de ahorro de bases. En mamíferos, el principal proceso de eliminación de amoníaco es el ciclo de la urea.

Formación de urea. Se produce en hígado a través de las siguientes reacciones: 1. *Síntesis de carbamilfosfato*: condensación de NH_3, CO_2 y fosfato (carbamilfosfato sintetasa 1). La reacción ocurre en mitocondrias; se hidrolizan 2 ATP. Requiere N-acetil glutamato. 2. *Síntesis de citrulina*: el carbamilo es transferido a ornitina (ornitina transcarbamilasa). Se forma citrulina que sale de mitocondria y continúa las siguientes etapas en el citosol. 3. *Síntesis de argininosuccinato*: la citrulina se une a aspartato (argininosuccinato sintetasa). El ATP se hidroliza a AMP y PP_i. 4. *Escisión de argininosuccinato*: argininosuccinasa, una liasa, divide argininosuccinato en fumarato y arginina. 5. *Hidrólisis de la arginina*: se forma urea y ornitina (arginasa). Para iniciar otro ciclo, la ornitina debe penetrar en mitocondria. Uno de los N de la urea procede principalmente del NH_3 producido por desaminación oxidativa de glutamato y el otro de aspartato, que adquiere su grupo amina por transaminación con oxaloacetato. El fumarato liberado en la reacción 4 es intermediario del ciclo del ácido cítrico. En este ciclo, el fumarato se convierte sucesivamente en malato y oxaloacetato, que por transaminación da aspartato. Esta estrecha asociación en el funcionamiento de los ciclos de urea y ácido cítrico contribuye a autosostener el proceso de formación de urea (en la oxidación de malato se generan 3 de los 4 ATP necesarios para la producción de una molécula de urea). La urea es excretada por orina.

Destino del esqueleto carbonado de aminoácidos. Los aa pueden clasificarse en glucogénicos y cetogénicos según su destino. Los glucogénicos forman al degradarse piruvato o intermediarios del ciclo del ácido cítrico. Los cetogénicos generan acetil-CoA o acetoacetato.

Mecanismos metabólicos generales. Descarboxilación. La pérdida del grupo carboxilo de aa da lugar a formación de aminas biológicas o biógenas, de intensa acción fisiológica. La reacción es catalizada por descarboxilasa (coenzima piridoxal fosfato). Por descarboxilación, la lisina forma cadaverina; la ornitina, putrescina; la histidina, histamina; la tirosina, tiramina; el triptófano, triptamina, y el ácido glutámico, ácido γ-aminobutírico. *Poliaminas*: espermidina y espermina se forman a partir de putrescina.

Transferencia de restos monocarbonados. Metilo, OH-metilo, formilo y CO_2 son utilizados en diversas síntesis. Catalizadas por metiltransferasas específicas. El principal donante de metilo es la "metionina activa" (S-adenosil metionina). Otros agentes de transporte de restos de un C son ácido tetrahidrofólico y metilcobalamina, ambos derivados de vitaminas del complejo B. El CO_2 es transferido en reacciones catalizadas por carboxilasas, con la coenzima biotina, vitamina del complejo B.

Vías metabólicas de fenilalanina y tirosina. *Degradación*: 1. La fenilalanina se convierte en tirosina (fenilalanina hidroxilasa y biopterina reductasa, O_2, tetrahidrobiopterina, NADPH). 2. Transaminación (tirosina aminotransferasa). Se forma p-OH-fenilpirúvico. 3. Oxidación y descarboxilación (p-OH-fenilpiruvato hidroxilasa). Se forma ácido homogentísico. 4. La homogentisato oxidasa cataliza la formación de maleilacetoacetato, que se isomeriza a fumarilacetoacetato. 5. Formación de fumarato y acetoacetato (fumarilacetoacetato hidrolasa). *Síntesis de catecolaminas*. 1. Formación de DOPA: la tirosina se convierte en 3,4-dihidroxifenilalanina (tirosina hidroxilasa, O_2, tetrahidrobiopterina). 2. Formación de dopamina: (DOPA descarboxilasa). 3. Formación de noradrenalina: dopamina es hidroxilada (dopamina-hidroxilasa, O_2, ácido ascórbico). 4. Formación de adrenalina: transmetilación desde 5-adenosil metionina (metiltransferasa). Las catecolaminas actúan como transmisores químicos del sistema adrenérgico. Su inactivación se realiza por monoamino oxidasa y catecol-O-metil transferasa. *Síntesis de melanina*: se forma primero DOPA y, después de varias etapas, melanina. *Síntesis de hormonas tiroideas*. *Errores congénitos de metabolismo*: falta de fenilalanina hidroxilasa o de dihidrobiopterina reductasa produce fenilcetonuria u oligofrenia fenilpirúvica; de homogentísico oxidasa, alcaptonuria; de tirosinasa en melanocitos, albinismo.

Metabolismo de triptófano. *Síntesis de serotonina*: 1. Hidroxilación en C 5 forma 5-OH-triptófano, luego se descarboxila a 5-OH-triptamina o serotonina. La monoamino oxidasa inactiva a la serotonina. *Síntesis de melatonina*: serotonina es acetilada y metilada. La melatonina es una hormona secretada por la glándula pineal. *Síntesis de ácido nicotínico*: ácido nicotínico (vitamina del complejo B) se sintetiza a partir de triptófano. *Putrefacción bacteriana*: en intestino, el triptófano forma indol, indol-acético, escatol, indoxilo, sal potásica de indoxilsulfato (indicán).

Síntesis de óxido nítrico. El NO˙ es un gas, radical libre. Importante mensajero químico. Se forma a partir de arginina por acción de óxido nítrico sintasa.

Utilización de aa en reacciones de desintoxicación. La glicina con ácido benzoico forma ácido hipúrico. A partir de cisteína se forma taurina, la cual se une a ácidos biliares para dar taurocolato. Por oxidación de azufre de cisteína y metionina se forma sulfato. En sulfoconjugaciones se utiliza "sulfato activo" (fosfoadenosina-fosfosulfato, PAPS).

Síntesis de creatina. Participan arginina, glicina y metionina. Se transfiere el grupo amidina de la arginina a glicina para dar ácido guanidoacético. Éste se metila y da creatina; donante del metilo es la S-adenosil metionina. La creatina forma creatinafosfato (fosfocreatina quinasa, ATP). La creatinafosfato es rica en energía; reserva energética en músculo. Por deshidratación, la creatina se convierte en creatinina, eliminada por orina.

Glutatión. Sus funciones están relacionadas con su poder reductor. *Síntesis*. Participan γ-glutamil-cisteína sintetasa y glutatión sintetasa. *Ciclo de γ-glutamilo*. Sistema de transporte de aminoácidos. La γ-glutamiltransferasa es la principal enzima del ciclo.

BIBLIOGRAFÍA

Glickman M.H., Ciechanover A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. Destruction for the sake of construction. *Physiological Reviews*, 82: 373-428.

Hershko A., Ciechanover A. (1998). The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry*, 67: 425-479.

Mann G.E., Yudilevich D.L., Sobrevia L. (2003). Regulation of amino acid and glucose trqansporters in endotelial and smooth muscle cells. *Physiological Reviews*, 83: 183-252.

Morris S.M. (2002). Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 22: 97-105.

Nath D., Shadan S. (Eds.). (2009). The ubiquitin system. *Nature*, 459: 421-468.

Scriver C.R., Beaudet A.l., Sly W.S., Valle D. (Eds.). (2001). *Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8va. Ed., McGraw Hill, Nueva York.

Watford M. (1991). The urea cycle: a two-compartment system. *Essays in Biochemistry*, 26: 49-58.

CAPÍTULO 17

Metabolismo del hemo

El hemo, una ferroporfirina, es el grupo prostético de moléculas de gran importancia funcional llamadas hemoproteínas. Entre ellas se cuentan *hemoglobina,* responsable del transporte de O_2 en sangre; *mioglobina*, molécula de depósito de O_2 en músculo; *citocromos*, agentes de transferencia de electrones, y diversas *enzimas* (catalasa, peroxidasas, triptófano pirrolasa, etc.).

El hemo está constituido por un ciclo tetrapirrólico derivado de protoporfirina III (o IX en la notación original de Fischer), con cuatro metilos en las posiciones 1, 3, 5 y 8, dos vinilos en 2 y 4 y dos restos propionato en 6 y 7. Un átomo de hierro ferroso se une a los nitrógenos de los pirroles (fig. 17-1).

El adulto normal produce alrededor de 300 mg de hemo por día para atender las necesidades de renovación de hemoproteínas en el organismo. Ochenta y cinco por ciento o más de la síntesis se realiza en las células precursoras de eritrocitos de la médula ósea y el resto en otros tejidos, principalmente hepático.

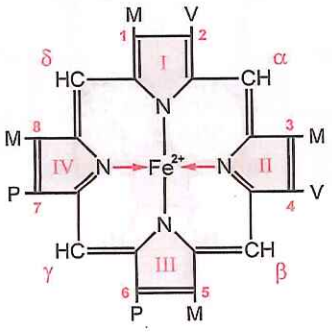


Fig. 17-1. Hemo. M: metilo, V: vinilo, P: propionato.

BIOSÍNTESIS DEL HEMO

El compuesto precursor, protoporfirina III, se sintetiza a partir de glicina y succinil-CoA en tres etapas: 1) síntesis de ácido δ-amino-levulínico; 2) formación de porfobilinógeno, y 3) síntesis de protoporfirina. El hemo se obtiene por adición de un átomo de hierro ferroso.

1. **Síntesis de ácido δ-aminolevulínico.** Succinil-CoA y glicina forman ácido δ-amino-levulínico (o 5-aminolevulínico). El succinil-CoA es intermediario del ciclo del ácido cítrico, generado en la etapa de descarboxilación de α-cetoglutarato. La glicina procede del fondo común de aminoácidos libres. La reacción es catalizada por δ-*aminolevulinato sintasa*, enzima mitocondrial dependiente de piridoxal fosfato y Mg^{2+}. Inicialmente se forma α-amino-β-cetoadipato, que rápidamente se descarboxila para dar δ-aminolevulinato (fig. 17-2). El CO_2 desprendido corresponde al carboxilo de la glicina.

La δ-aminolevulinato sintasa es el principal sitio de control de la síntesis de porfirina. El producto final, hemo, ejerce acción alostérica inhibitoria. Además, el hemo, la hemoglobina y otras hemoproteínas, actúan como "correpresores" de la síntesis, lo cual produce rápida disminución de actividad, pues la vida media de la enzima es muy corta (alrededor de 1 hora en hígado). La hipoxia, la eritropoyetina, algunas hormonas esteroides, fármacos (barbitúricos) y alcohol, en

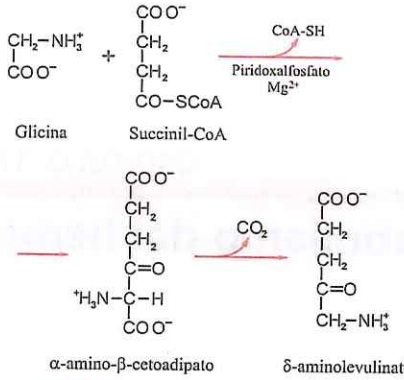


Fig. 17-2. Biosíntesis de δ-aminolevulinato.

cambio, inducen la síntesis de δ-aminolevulinato sintasa (en el capítulo 22 se considerarán mecanismos de inducción y represión de la síntesis de proteínas).

2. **Síntesis de porfobilinógeno.** El δ-aminolevulinato, formado dentro de las mitocondrias, debe pasar al citosol para cumplir la segunda etapa, catalizada por δ-*aminolevulinato deshidrasa*, también llamada *porfobilinógeno sintasa*. Esta enzima citosólica contiene Zn^{2+} y grupos sulfhidrilo esenciales para su actividad; por esta razón es sensible a reactivos de grupos SH, por ejemplo, metales pesados (plomo). El hemo actúa como inhibidor de la porfobilinógeno sintasa y también reprime la síntesis de la enzima.

Dos moléculas de ácido δ-aminolevulínico reaccionan entre sí con pérdida de agua para formar porfobilinógeno, compuesto que contiene el núcleo pirrol (fig. 17-3).

La inhibición de la porfobilinógeno sintasa resulta en aumento de ácido δ-aminolevulínico (ALA), ya que la falla en la síntesis de hemo que sucede, anula la represión de la transcripción del gen de ALA sintasa. Niveles elevados de ALA se cree que causan algunos de los efectos neurológicos de la intoxicación por Pb.

3. **Formación de porfirina.** En esta etapa, cuatro moléculas de porfobilinógeno forman el anillo tetrapirrólico de uroporfirinógeno. La figura 17-4 indica la procedencia de los elementos constituyentes de la porfirina.

La porphobilinógeno deaminasa elimina el grupo amina terminal de la cadena lateral metilamina del porfobilinógeno y se forman puentes metileno ($-CH_2-$) entre los pirroles. Se obtienen uroporfirinógenos I y III (fig. 17-5); en el isómero I, las cadenas laterales acetato (A) y propionato (P) están dispuestas simétricamente, mientras el

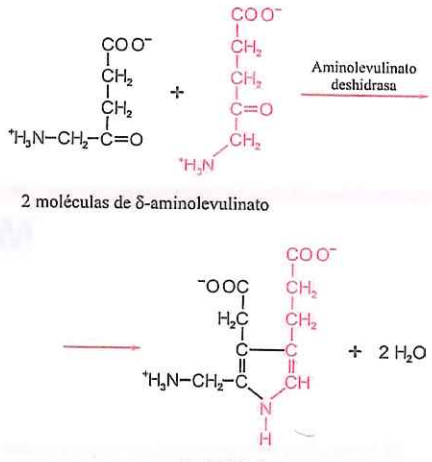


Fig. 17-3. Biosíntesis de porfobilinógeno. Se ha representado uno de los δ-aminolevulinatos en negro y el otro en rojo para mostrar la contribución de cada uno en la formación del grupo pirrol y de las cadenas laterales propionato y acetato.

III presenta asimetría (cambia la posición de A y P en el pirrol IV). El más abundante de los isómeros formados es el uroporfirinógeno III, precursor de hemo. El uroporfirinógeno I y sus derivados, uroporfirina I y coproporfirinógeno I, no tienen función conocida; son eliminados por orina y heces respectivamente. El uroporfirinógeno III es

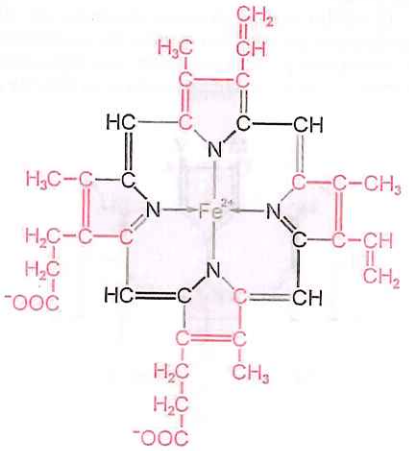


Fig. 17-4. Procedencia de los elementos constituyentes del anillo porfirínico del hemo. Los elementos en rojo proceden del succinil-CoA; en negro, de glicina.

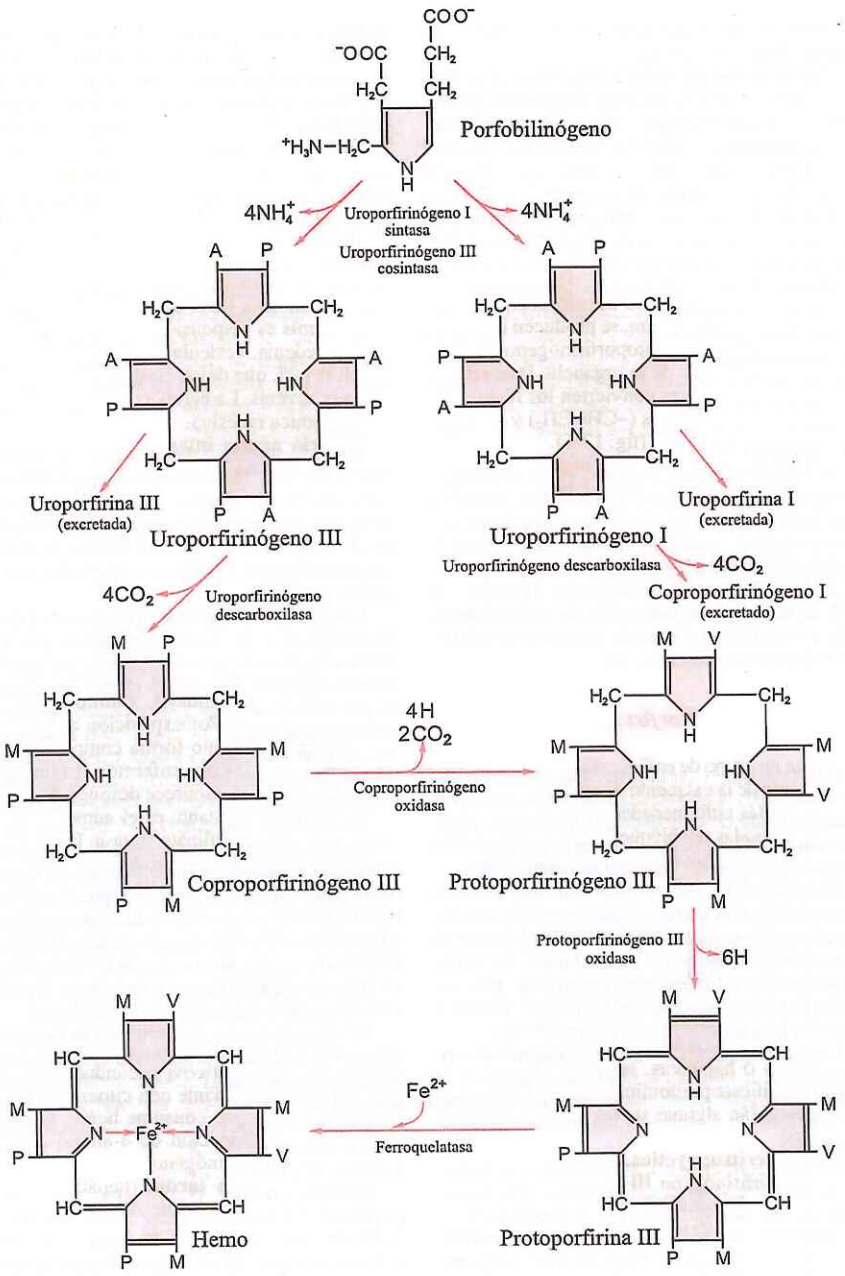


Fig. 17-5. Etapas de la biosíntesis de hemo a partir de porfobilinógeno. A: acetato, P: propionato, M: metilo, V: vinilo.

oxidado en pequeña proporción a uroporfirina III, que también es excretada.

La formación del anillo tetrapirrólico resulta de la interacción de dos enzimas: *uroporfirinógeno I sintasa* y *uroporfirinógeno III cosintasa*. Las reacciones siguientes modifican las cadenas laterales y producen oxidaciones que disminuyen el grado de saturación del anillo. El uroporfirinógeno III es convertido en coproporfirinógeno III por descarboxilación de los acetatos en las posiciones 1, 3, 5 y 8, que se convierten en metilos. La reacción es catalizada por *uroporfirinógeno descarboxilasa*.

De aquí en adelante las transformaciones restantes, hasta generar hemo, se producen dentro de las mitocondrias; el coproporfirinógeno III debe penetrar en la matriz de la organela. Descarboxilaciones y oxidaciones convierten los restos propionatos 2 y 4 en vinilos ($-CH=CH_2$) y se forma protoporfirina III (o IX) (fig. 17-5).

4. **Adición de Fe.** La etapa final es la incorporación de hierro ferroso (Fe^{2+}) a la protoporfirina para formar hemo. La reacción es catalizada por *ferroquelatasa*, también llamada *hemo sintasa*, enzima de localización mitocondrial.

Del total de hemo sintetizado, alrededor de 85% es destinado a formación de hemoglobina, 10% a mioglobina y el resto a otras hemoproteínas (citocromos, catalasa, etc.).

Porfirias

Existe un grupo de enfermedades caracterizadas por aumento de la excreción de porfirinas o sus precursores. Estas enfermedades, denominadas *porfirias*, son causadas por bloqueos en la vía de síntesis de hemo y pueden ser hereditarias o adquiridas.

En general se caracterizan por acumulación de intermediarios de las etapas anteriores a la catalizada por la enzima afectada y disminución de los metabolitos de los pasos siguientes. En todas, la producción de hemo está deprimida; esto estimula la síntesis de δ-aminolevulinato sintasa y exacerba la acumulación de intermediarios.

Las porfirias hereditarias se distinguen en eritropoyéticas o hepáticas, según el órgano en el cual se manifieste predominantemente el defecto. Se mencionarán algunas de las enfermedades de este grupo.

Porfiria eritropoyética. Es debida a deficiencia de uroporfirinógeno III cosintasa. En consecuencia, hay desequilibrio en la producción de los isómeros de uroporfirinógeno; al contrario de lo normal, el isómero I excede marcadamente en cantidad al III. Como el uroporfirinógeno I no es utilizado en síntesis de hemo ni tiene papel fisiológico alguno, sus niveles en sangre y médula ósea, así como los de sus derivados uroporfirina I y coproporfirinógeno I, aumentan marcadamente y son excretados por orina y heces en grandes cantidades. Estas sustancias son coloreadas, la orina de los pacientes es de color rojo. El síntoma más importante es la fotosensibilidad cutánea, debido a la propiedad de las porfirinas de absorber radiaciones en la longitud de onda de 400 nm y adquirir un estado "excitado" que transmite su energía a oxígeno molecular, con producción de radicales libres, muy reactivos. La formación de radicales libres a nivel de capilares superficiales de la dermis es responsable de la producción de eritema, edema, vesículas, ampollas y ulceraciones en la piel, que dejan cicatrices y deformaciones muy severas. La herencia de esta enfermedad es autosómica recesiva.

Porfiria aguda intermitente (hepática). Se debe a defectos en la síntesis de uroporfirinógeno I sintasa. Es un carácter codominante; los heterocigotas, con un alelo normal y otro defectuoso en el locus de la enzima, producen la mitad de uroporfirinógeno I sintasa comparados con individuos normales.

Los pacientes excretan gran cantidad de porfobilinógeno y de δ-aminolevulinato por orina. Estos compuestos son incoloros y no producen fotosensibilidad. El cuadro clínico se caracteriza por cólicos abdominales, vómitos y síntomas neuropsiquiátricos. Por exposición al aire y a la luz, el porfobilinógeno forma compuestos coloreados; la orina de estos enfermos, originalmente de color normal, se oscurece después de emitida.

Un hallazgo constante es el aumento de actividad de δ-aminolevulinato sintasa. Esto se explica porque al disminuir la producción de hemo no opera el mecanismo normal de represión de la síntesis de enzima por producto final. Se ha propuesto administrar a estos pacientes hematina (ferrihemo) intravenosamente, lo cual atenúa la "desrepresión" de aminolevulinato sintasa y disminuye la producción de aminolevulinato y porfobilinógeno.

En algunos casos, los síntomas se desencadenan en alcoholistas crónicos o por administración de fármacos (barbitúricos) que inducen la expresión del sistema oxidante con citocromo P_{450}. La síntesis de citocromo consume hemo, lo que favorece mayor producción de δ-amino sintasa y acúmulo de porfobilinógeno.

Porfiria cutánea tardía (hepática y eritropoyética). Enfermedad autosómica recesiva, es la forma más común de este grupo. Se debería a deficiencia parcial de uroporfirinógeno descarboxilasa. El hígado de pacientes afectados por esta enfermedad contiene gran cantidad de por-

firinas. El principal síntoma es fotosensibilidad cutánea. Basta una leve exposición a la luz para producir ampollas y lesiones en la piel. La orina tiene color que puede ir de rojo a café cuando se la observa con luz natural, y de rosa a rojo con luz fluorescente.

A veces la aparición de los síntomas depende de factores como exposición a la luz solar, infecciones por virus (HIV, hepatitis B o C) o sobrecarga de hierro.

Porfirias adquiridas. Resultan de la acción de agentes tóxicos como plomo y otros metales pesados, hexaclorobenceno, el antibiótico griseofulvina, productos que inhiben enzimas de la vía de síntesis de hemo, especialmente aminolevulinato deshidrasa, uroporfirinógeno sintasa y ferroquelatasa. Se produce aumento de excreción de δ-aminolevulinato. La determinación de este compuesto en orina y de la actividad de δ-aminolevulinato deshidrasa en sangre sirven de indicadores de la magnitud de la intoxicación.

CATABOLISMO DE HEMO

La vida promedio de los glóbulos rojos es de unos 120 días, lapso al cabo del cual son destruidos en el sistema de fagocitos mononucleares (SFM), antes llamado sistema reticuloendotelial (SRE).

Un hombre normal de 70 kg de peso tiene aproximadamente 750 g de hemoglobina en sangre circulante, de los cuales 6,25 g son degradados por día. Deben considerarse separadamente los destinos de la porción proteínica globina y del grupo prostético hemo.

La globina es tratada como todas las proteínas que cumplen su ciclo en el organismo, esto es, es hidrolizada en sus aminoácidos constituyentes, los que son reutilizados en nuevas síntesis. El hemo sufre transformaciones específicas en varias etapas, cumplidas en el sistema de fagocitos mononucleares, hígado e intestino.

Etapas del SFM. La fase inicial se lleva a cabo en células del sistema de fagocitos mononucleares, principalmente en hígado, bazo y médula ósea. Un sistema multienzimático *hemo-oxigenasa* de retículo endoplásmico liso cataliza oxidaciones que convierten el hierro ferroso en férrico y el carbono del puente metino α (entre pirroles I y II) en monóxido de carbono (CO), lo que produce apertura del anillo tetrapirrólico. Participan en estas reacciones oxígeno molecular y NADPH (fig. 17-6). El hierro es separado de inmediato. El organismo administra el hierro con gran sentido de economía; cada átomo es

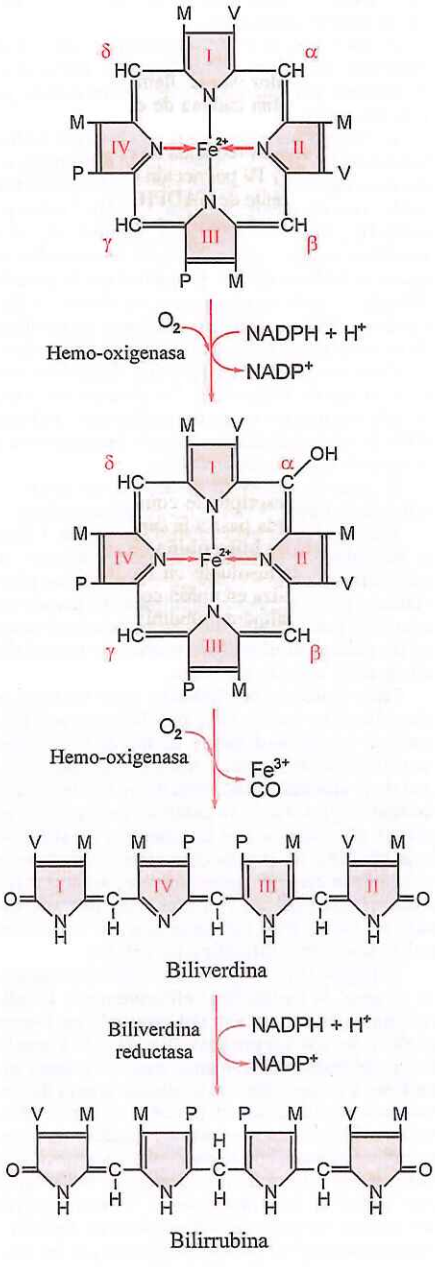


Fig. 17-6. Catabolismo del hemo en SFM.

celosamente conservado y reutilizado en síntesis de nuevas moléculas.

El producto de estas transformaciones es un pigmento de color verde llamado *biliverdina*, constituido por una cadena de cuatro grupos pirrol, sin hierro.

La biliverdina es reducida en el puente metino entre pirroles III y IV por acción de *biliverdina reductasa*, dependiente de NADPH. El producto formado, con un puente metileno (–CH_2–) entre pirroles III y IV, es la *bilirrubina*, pigmento de color amarillo-naranja. Este compuesto es insoluble en agua y soluble en lípidos, propiedad que le permite difundir a través de membranas celulares. La bilirrubina es tóxica; interfiere funciones metabólicas de las células por mecanismos aún desconocidos.

Cada gramo de hemoglobina degradada origina 35 mg de bilirrubina. La producción diaria de este compuesto es aproximadamente 300 mg; 80% de esta cantidad procede de hemoglobina y el resto de otras hemoproteínas.

El proceso descripto se cumple en SFM. La bilirrubina formada pasa a la sangre circulante.

Transporte de bilirrubina en sangre. Como la bilirrubina es insoluble en medio acuoso, su transporte se realiza en unión con proteínas plasmáticas, principalmente albúmina, formando un complejo macromolecular que no puede penetrar en las células ni ultrafiltrar a nivel de glomérulo renal; no se excreta por orina.

Cada molécula de albúmina tiene un sitio de alta afinidad y otro de baja afinidad para unir bilirrubina. Aproximadamente 25 mg de bilirrubina son firmemente fijados a los sitios de alta afinidad de la albúmina contenida en un dL de plasma normal (4 g). Cuando la cantidad de pigmento es mayor, el exceso se une laxamente a los sitios de baja afinidad. Si la concentración de bilirrubina insoluble se eleva exageradamente, se saturan los sitios de alta afinidad y el excedente es transportado en unión lábil con proteínas, de las cuales puede liberarse y difundir a las células.

El hígado del recién nacido, todavía inmaduro, es incapaz de metabolizar eficientemente la bilirrubina; la concentración del pigmento en sangre se eleva durante los primeros días de vida. Cuando la hiperbilirrubinemia alcanza concentraciones superiores a la capacidad de la albúmina para fijarla, escapa hacia las células y puede producir cuadros tóxicos. El problema se acentúa cuando se suma hemólisis intensa, con el consiguiente aumento de hemo a degradar y de producción de bilirrubina; esto ocurre en la *eritroblastosis*. El compromiso del sistema nervioso central en casos de hiperbilirrubinemia muy elevada se manifiesta por un cuadro clínico grave denominado *kernicterus*.

Etapa hepática. Al llegar al hígado, la bilirrubina es separada de su unión con albúmina y penetra en las células por difusión facilitada, mediada por un transportador de la membrana plasmática que algunos autores llaman *bilitranslocasa*. Una vez dentro de los hepatocitos el pigmento se une a proteínas aceptoras que la atrapan en el citosol. En las células hepáticas se han aislado varias proteínas que fijan bilirrubina; la mejor caracterizada es llamada *ligandina* o *proteína Y*. Actualmente se la ha identificado como *glutatión-S-transferasa* (GST). Esta proteína tiene actividad enzimática y también une ligandos que no son sustratos.

En la célula la bilirrubina es conjugada con moléculas muy polares y convertida en un producto hidrosoluble, apto para ser excretado y vehiculizado en la bilis. El proceso de conjugación se lleva a cabo en retículo endoplásmico liso; consiste en la adición de restos de ácido glucurónico a las cadenas propionato de la bilirrubina. La reacción es catalizada por *bilirrubina-glucuronil transferasa* (BGT); el dador de ácido glucurónico es uridinadifosfato-glucurónico (UDP-glucurónico). Se forman *mono-* y *diglucurónido de*

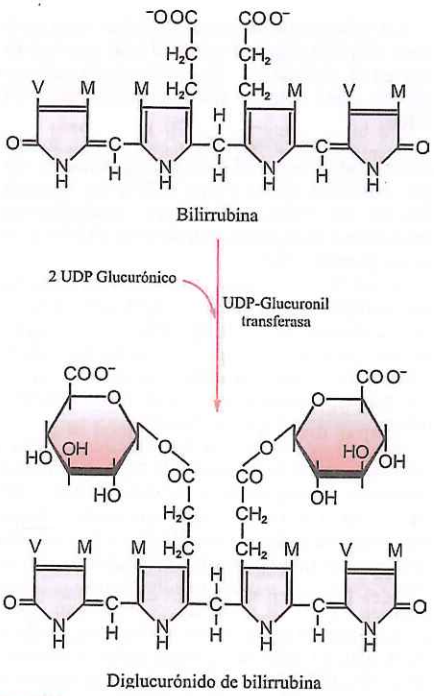


Fig. 17-7. Conjugación de bilirrubina y ácido glucurónico.

bilirrubina (fig. 17-7), que son secretados hacia los conductillos biliares por un mecanismo de transporte activo.

El transportador es la proteína de resistencia a múltiples sustancias (MRP-2) también llamado transportador multiespecífico de aniones orgánicos (MOAT) del tipo ABC (pág. 317).

La glucuronil transferasa y el sistema de transporte aumentan su actividad por administración de fármacos, por ejemplo barbitúricos. Se dice por ello que esos sistemas son "inducibles".

En condiciones fisiológicas, toda la bilirrubina secretada en la bilis es conjugada. En el adulto normal, de 70 a 90% de los pigmentos biliares corresponde a diglucurónido de bilirrubina y 7 a 27%, a monoglucurónido. En el recién nacido la actividad de BGT es reducida, razón por la cual la bilis contiene menor proporción de diglucurónido.

Bilirrubinas directa e indirecta. En 1913, van den Bergh distinguió dos formas de bilirrubina mediante una reacción colorimétrica con ácido sulfanílico diazotado. Una de esas formas recibió el nombre de *bilirrubina directa*, pues da reacción inmediata con el diazorreactivo. La otra sólo reacciona después de agregar alcohol a la mezcla; se la designó *bilirrubina indirecta*. La bilirrubina directa es diglucurónido de bilirrubina, es decir, el producto soluble en agua formado durante el pasaje del pigmento por la célula hepática. La bilirrubina indirecta, en cambio, corresponde al pigmento formado en el SRE, aún no conjugado con glucuronato.

En el plasma sanguíneo normal existe pequeña cantidad de bilirrubina, en su casi totalidad de tipo indirecto, insoluble en medio acuoso, transportada en unión con albúmina. La concentración normal es menor de 1,0 mg por dL. Valores superiores a 1,5 mg por dL se consideran anormales (hiperbilirrubinemia).

Etapa intestinal. Llegado al tracto intestinal, el glucurónido de bilirrubina es hidrolizado y la bilirrubina sometida a la acción reductora de sistemas enzimáticos de bacterias anaerobias de la flora intestinal. El primer compuesto formado es *mesobilirrubinógeno*; después de una serie de transformaciones se llega al producto final, *estercobilinógeno*, compuesto incoloro que se elimina parcialmente con las materias fecales.

En contacto con el aire, el estercobilinógeno se oxida y se convierte en *estercobilina* o *urobilina*, pigmento color pardusco que contribuye a la coloración normal de las heces. Estercobilina y urobilina son compuestos similares pero no necesariamente idénticos. Debido a la existencia de varias dobles ligaduras, estas moléculas generan, por oxidorreducción, una familia de productos llamados *urobilinoides*.

Ciclo enterohepático. Parte de los productos derivados de la reducción de bilirrubina en intestino se reabsorbe y por vía portal vuelve al hígado, que los oxida, regenera glucurónidos de bilirrubina y los excreta nuevamente con la bilis hacia el intestino. Se cierra así el llamado *ciclo enterohepático*.

Pigmentos urinarios. No todos los pigmentos reabsorbidos son transformados y reexcretados por hígado hacia el intestino; algunos pasan a la circulación general y son eliminados por riñón (1 a 4 mg por día). En orina, el compuesto recibe el nombre de urobilinógeno, que por oxidación origina el pigmento urobilina (urobilinoides). Estercobilinoides y urobilinoides pertenecen a la misma familia de compuestos, su nombre diferente sólo indica la vía por la cual se eliminan.

Las figura 17-6 muestra las etapas del catabolismo del hemo.

Ictericia. Distintos cuadros patológicos pueden alterar el catabolismo del hemo. Un fenómeno de frecuente observación en clínica es el incremento de la concentración de bilirrubina en sangre. El pigmento pasa a los tejidos y les da tinte amarillento cuando la bilirrubinemia excede 2 a 2,5 mg por dL. Esto se hace visible en tegumentos y especialmente en la esclerótica, configurando un signo denominado *ictericia*.

Según el mecanismo de producción, pueden considerarse tres tipos principales de ictericia: a)

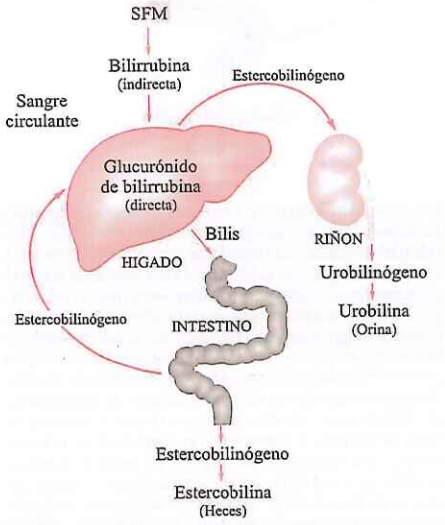


Fig. 17-8. Representación esquemática de las transformaciones de pigmentos derivados del hemo.

por hemólisis exagerada, b) por obstrucción de vías biliares y c) debidas a insuficiencia funcional del parénquima hepático.

La determinación de la concentración de bilirrubina directa y total en sangre y de la cantidad de urobilinoides excretrada por orina en 24 horas proveen información útil para el diagnóstico del tipo de ictericia.

Las figuras 17-9, 17-10 y 17-11 presentan los aspectos más importantes de estos cuadros. Debe aclararse, sin embargo, que en clínica la situación no siempre es tan esquemática; a menudo aparecen mezclados elementos de más de una de las entidades descriptas.

Es evidente aquí cómo el conocimiento de las bases bioquímicas de un proceso fisiológico permite interpretar racionalmente sus alteraciones. Esto es válido en todas las áreas de la medicina.

Se ha mencionado anteriormente la posibilidad de hiperbilirrubinemia en el recién nacido, fundamentalmente debida a incapacidad del hígado para captar y conjugar bilirrubina. Se eleva la bilirrubina indirecta o no conjugada en sangre, lo cual puede tener efectos tóxicos, particularmente en cerebro (kernícterus). La bilirrubina no conjugada daña las mitocondrias de astrocitos y neuronas, lo que altera el metabolismo energético e induce apoptosis, y afecta a la membrana plasmática, perturbando el transporte de neurotransmisores.

Cuando la concentración de bilirrubina indirecta en plasma excede límites considerados de riesgo (20 mg por dL), se recurre a procedimientos terapéuticos. Uno muy utilizado es la fototerapia;

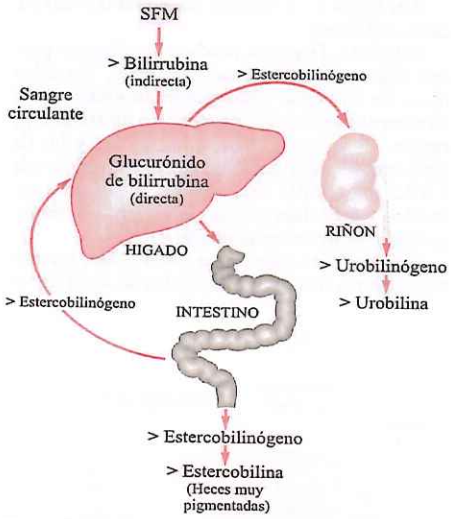


Fig. 17-9. Alteraciones en *ictericias hemolíticas* (esquema). La destrucción exagerada de glóbulos rojos genera mayor cantidad de bilirrubina; ésta pasa a la sangre (hiperbilirrubinemia), donde es transportada unida a albúmina formando un complejo macromolecular (bilirrubina indirecta) que no ultrafiltra en riñón. En orina no se encuentra bilirrubina a pesar de su aumento en sangre circulante. Existe exceso de oferta de bilirrubina al hígado, órgano en el cual se produce glucuronidación para dar bilirrubina directa, excretada en la bilis en cantidades mayores que las normales. El aumento de glucurónidos de bilirrubina en intestino determina mayor producción de estercobilinógeno e incremento de pigmentos en materias fecales, que adquieren coloración muy intensa. Aumenta también la reabsorción de estercobilinógeno a través del sistema de la vena porta. Pasa estercobilinógeno a la circulación general y se excreta por orina. La eliminación renal de urobilinoides está aumentada.

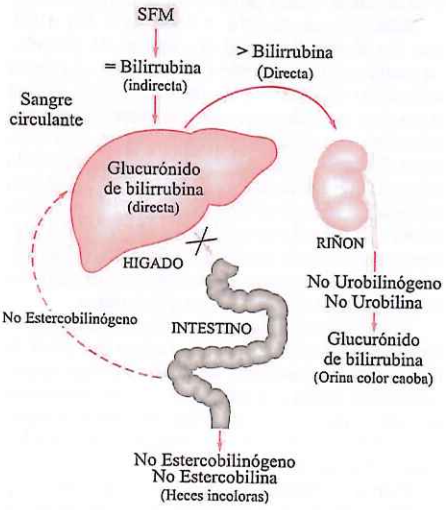


Fig. 17-10. Alteraciones en ictericias producidas por *obstrucción de vías biliares*. La producción de bilirrubina en SFM y el nivel de bilirrubina indirecta en plasma sanguíneo son normales. El hígado forma glucurónidos de bilirrubina, pero la obstrucción de vías biliares no permite su excreción hacia intestino. El estancamiento en conductos biliares produce alteraciones en la estructura de lobulillos hepáticos hasta dejar pasar bilis a los capilares sanguíneos. El nivel de bilirrubina en sangre aumenta, principalmente la de tipo directo (glucurónido soluble), filtrable en glomérulos renales. Se excretan glucurónidos de bilirrubina en la orina, que adquiere color caoba. Como no llega bilis al intestino, no se forma estercobilinógeno. Las heces no presentan su color normal, sino un gris claro que le da aspecto de "masilla". No hay reabsorción a través del ciclo enterohepático y no se excretan urobilinoides por orina.

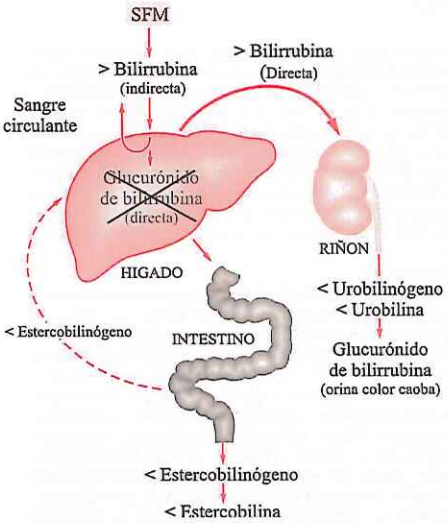


Fig. 17-11. Alteraciones en ictericias por *insuficiencia funcional hepática*. La producción de bilirrubina indirecta en SFM es normal. El hígado, disminuido en su capacidad funcional, no puede procesar toda la bilirrubina que recibe y sólo parte de ella es glucuronidada. El remanente de bilirrubina no modificada vuelve a la sangre, lo cual explica el aumento de bilirrubina indirecta en plasma. Por otra parte, en condiciones que producen este tipo de ictericia, es común la existencia de alteraciones en parénquima hepático, con reflujo de bilis hacia capilares sanguíneos. Esto explica el posible aumento de bilirrubina directa (glucurónido) en plasma de estos pacientes. La bilirrubina directa se elimina por riñón y da color oscuro a la orina. Hay disminución de producción y excreción de bilis a intestino, lo cual determina reducción de la cantidad de urobilinoides en heces y orina.

el niño es expuesto a luz intensa durante el tiempo necesario para reducir la bilirrubinemia. Este método se basa en la fotolabilidad de la bilirrubina. Expuesta a la luz y en presencia de oxígeno se descompone en productos hidrosolubles fácilmente eliminados. La bilirrubina en sangre de capilares cutáneos superficiales y en tegumentos es alcanzada por la radiación lumínica y descompuesta. De esta manera se obtiene una más rápida reducción de los niveles del pigmento en la sangre.

Existen defectos del gen que codifica para bilirrubina-uridil-glucuronil transferasa que causan elevación no hemolítica de la bilirrubina no conjugada, heredados con carácter autosómico recesivo. Uno de ellos es el *síndrome de Crigler-Najjar tipo I*, en el cual hay ausencia total de la enzima en hígado. Los valores de bilirrubina indirecta en plasma se encuentran entre 20 y 25 mg/dL. Sin tratamiento, la mayoría de pacientes muere por kernícterus dentro de los primeros 18 meses de vida. Excepcionalmente sobreviven hasta la pubertad y fallecen antes de la adultez con encefalopatía. La única cura posible es el transplante de hígado. *El síndrome de Crigler-Najjar tipo II* es una variante menos severa, no hay falta absoluta de la enzima. La bilirrubina indirecta en plasma oscilan entre 7 y 20 mg/dL, el principal pigmento en bilis es monoglucurónido, cuando lo normal es menos del 20%.

Otro defecto en el cual la actividad de bilirrubina-uridil-glucuronil transferasa se reduce en un 30% de la normal; es el *síndrome de Gilbert*, con valores de bilirrubina no conjugada en plasma de no más de 3 mg/dl. Además de ictericia, se manifiesta fatiga, malestar abdominal, ansiedad.

Alteraciones en la excreción de bilis pueden provocar aumento de bilirrubina conjugada en plasma. El *síndrome de Dubin-Johnson* es una enfermedad hereditaria debida a colestasis intrahepática por trastornos en la excreción canalicular de bilis. Los valores de bilirrubina directa en plasma usualmente están entre 2 y 5 mg/dL. Esta rara enfermedad es más frecuente en individuos judíos originarios de Medio Oriente.

El *síndrome de Rotor* es otro defecto con aumento de bilirrubina directa en plasma, heredado con carácter autosómico recesivo. El *síndrome de Alagille*, autosómico dominante, afecta el desarrollo de ductos biliares.

RESUMEN

Biosíntesis de hemo. La protoporfirina III o IX, precursora del hemo, se sintetiza a través de las siguientes etapas: 1. *Síntesis de ácido δ-aminolevulínico*: la δ-aminolevulinato sintasa cataliza la unión de succinil-CoA y glicina. Se desprende CO_2. Etapa regulable, inhibida por hemo. 2. *Síntesis de porfobilinógeno*: dos moléculas de δ-aminolevulinato reaccionan con pérdida de dos moléculas de agua (δ-aminolevulinato deshidrasa o porfobilinógeno sintasa). Inhibida por metales pesados (plomo). 3. *Formación de porfirina*: se unen 4 moléculas de porfobilinógeno y se forma uroporfirinógeno, anillo tetrapirrólico. Se producen isómeros I y III, este último en mayor cantidad (uroporfirinógeno I sintasa y uroporfirinógeno III cosintasa). El uroporfirinógeno III es convertido en coproporfirinógeno III por descarboxilación de las cadenas acetato en posiciones 1, 3, 5 y 8 (uroporfirinógeno descarboxilasa). Luego se producen oxidaciones y descarboxilaciones para dar finalmente protoporfirina III o IX. 4. *Formación de hemo*: se incorpora Fe^{2+} (ferroquelatasa o hemosintasa). Del total de hemo sintetizado, 85% es destinado a formación de Hb, 10% a mioglobina y el resto a otras hemoproteínas (citocromos, catalasa, etc.).

Porfirias. Se producen por bloqueos en la vía de síntesis de hemo.

Catabolismo de hemo. La vida promedio de glóbulos rojos es 120 días. Después de este lapso, son destruidos y la Hb degradada. La globina es hidrolizada a aminoácidos y el hemo sufre las siguientes transformaciones: *Etapa del de fagocitos mononucleares (SFM):* en células del SFM existe un sistema multienzimático hemo-oxigenasa en el que participan O_2 y NADPH. El Fe^{2+} se oxida a Fe^{3+} y el C del puente metino a CO. El Fe^{3+} se separa inmediatamente; se forma biliverdina, luego reducida a bilirrubina (biliverdina reductasa, NADPH). *Transporte de bilirrubina en sangre*: la bilirrubina se une a albúmina en un complejo macromolecular que no ultrafiltra en glomérulos renales. *Etapa hepática*: los hepatocitos captan bilirrubina de la sangre. Existe un transportador en la membrana y proteínas en citoplasma que fijan bilirrubina (ligandina, proteína Y o glutatión-S-transferasa). Dentro del hepatocito se produce conjugación con ácido glucurónico (transferido desde UDP-glucurónico) para formar mono- y diglucurónidos de bilirrubina (bilirrubina-glucuronil transferasa), compuestos solubles en medio acuoso que se eliminan hacia la bilis por transporte activo. La enzima y el transportador son inducibles. La bilirrubina conjugada es llamada directa; la no conjugada, indirecta. Normalmente, en sangre sólo existe bilirrubina indirecta, en cantidad menor de 1 mg por dL; no se excreta por orina. En situaciones patológicas con bilirrubina conjugada o directa en plasma, ésta aparece en orina. *Etapa intestinal*: al llegar a intestino, los glucurónidos de bilirrubina son hidrolizados y la bilirrubina sometida a reducciones. Se forma mesobilirrubinógeno y finalmente estercobilinógeno, que se elimina por las heces. En contacto con aire se oxida a estercobilina, pigmento que da color a las materias fecales. *Ciclo enterohepático*: parte de los productos derivados de reducción de bilirrubina en intestino son reabsorbidos y retornan al hígado, donde se regeneran glucurónidos de bilirrubina, nuevamente excretados con la bilis. *Pigmentos urinarios*: parte de los pigmentos reabsorbidos en intestino pasan a circulación general y se eliminan por riñón como urobilinógeno, que se oxida a urobilina (1 a 4 mg por dia); en realidad, se excreta una familia de compuestos llamados urobilinoides.

El aumento de bilirrubina en la sangre es un signo observado en distintos cuadros patológicos. Los tegumentos adquieren tinte amarillento (*ictericia*).

BIBLIOGRAFÍA

Erlinger S., Arias I.M., Dhumeneaux D. (2014). Inherited defects of bilirubin transport and conjugation: New insights into molecular mechanisms and consequences. *Gastroenterology*, 146: 1625-1638.

Fevery J. (2008). Bilirubin in clinical practice: a review. *Liver International*, 28: 592-605.

Gourlay G.R. (1997). Bilirrubin metabolism and kernicterus. *Advances in Pediatrics*, 44: 173-229.

Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D. (2001). *Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8va. Ed., McGraw Hill, Nueva York.

Yamada T. y col. (2003). *Textbook of Gastroenterology*, 4ta. Ed., Lippincott Co., Filadelfia.

Zakim D., Boyer T.D. (2002). *Hepatology*, 4ta. Ed., W.S. Saunders Co., Filadelfia.

CAPÍTULO 18

Metabolismo de purinas y pirimidinas

Los ácidos nucleicos de los alimentos son degradados en intestino a nucleótidos libres y éstos, a su vez, a nucleósidos y fosfato. Los nucleósidos son absorbidos como tales, o hidrolizados por nucleosidasas que separan la base nitrogenada y la pentosa correspondientes. Parte de las bases liberadas en la luz intestinal es degradada *in situ* por acción de bacterias de la flora normal; el resto se absorbe y pasa a la circulación portal.

Las purinas y pirimidinas no son un requerimiento dietario indispensable; las bases nitrogenadas se producen en las células con tal eficiencia que el organismo puede prescindir del aporte externo. La mayor parte de bases procedentes de los alimentos son degradadas y sus productos finales excretados, mientras la síntesis de nuevos nucleótidos y polinucleótidos se realiza con purinas y pirimidinas generadas en las células. Al parecer, de todas las bases provistas por la dieta, sólo la adenina es aprovechada, en pequeña proporción, en la producción de nuevas moléculas. La guanina y las bases pirimídicas ingresadas desde el exterior no son utilizadas. El resultado de esta virtual separación entre bases exógenas y endógenas es la existencia de dos conjuntos (*pools*) metabólicamente independientes.

Los ácidos nucleicos del organismo están en permanente recambio. Una parte de las bases liberadas durante procesos de degradación es reutilizada en síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos, a través de vías llamadas de "recuperación". El resto es catabolizado y los productos finales son excretados (fig. 18-1).

Fig. 18-1. Resumen del metabolismo de bases púricas y pirimídicas.

Biosíntesis de purinas

El anillo purina se sintetiza en las células a partir de moléculas o restos moleculares pequeños. De los componentes iniciales, el aminoácido glicina es el de mayor tamaño; los restantes son restos monocarbonados o grupos $-NH_2$ transferidos desde distintas fuentes. Estudios con elementos isotópicos han permitido establecer el origen de cada uno de los átomos constituyentes del núcleo purina (fig. 18-2).

Los carbonos 4 y 5 y el nitrógeno 7 del heterociclo proceden de glicina; los nitrógenos 3 y 9 derivan del grupo amida de glutamina; el nitrógeno 1, de aspartato; los carbonos 2 y 8, de restos formilo transportados por ácido tetrahidrofólico. El átomo de carbono en posición 6 procede de CO_2 del medio, transferido en una reacción con biotina como coenzima.

El ensamble de segmentos moleculares de origen tan diverso se efectúa en una serie de reacciones en la cual participa, desde el comienzo,

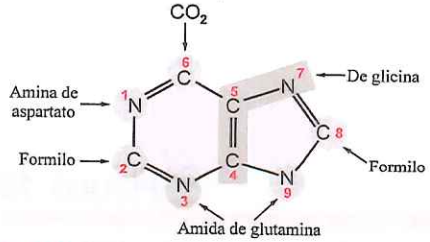
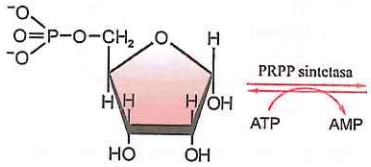


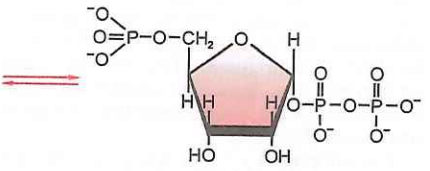
Fig. 18-2. Biosíntesis del núcleo purina. Procedencia de carbonos y nitrógenos.

ribosa-5-fosfato. Como las adiciones de los fragmentos constituyentes del anillo purina se realizan con ribosa-5-fosfato ya unida al conjunto, al final se obtiene un nucleótido y no purina libre.

La porción ribosa-5-fosfato del nucleótido es generada a partir de glucosa, en la vía de pentosa fosfato (pág. 276). A fin de participar en la biosíntesis de nucleótidos, la ribosa-5-fosfato es activada por transferencia de pirofosfato cedido por ATP al carbono 1 de la pentosa. La reacción es catalizada por *fosforribosilpirofosfato* sintetasa (o ATP-ribosa-5-fosfatopirofosfato ligasa), quinasa muy peculiar, pues transfiere pirofosfato en lugar del fosfato habitual en este tipo de enzimas. Se forma 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP), compuesto cuyo carbono 1 tiene configuración α.



Ribosa-5-fosfato

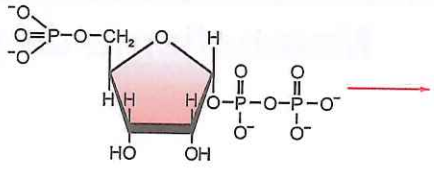


5-fosforribosil-1-pirofosfato

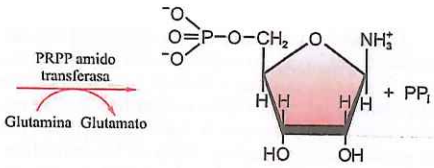
El fosforribosilpirofosfato es un compuesto muy importante; participa en síntesis de purinas y pirimidinas y en la vía de recuperación de purinas.

La PRPP sintetasa es activada por fosfato e inhibida por nucleótidos de purina y pirimidina, lo cual constituye un ejemplo de control por retroalimentación.

El ensamble de fragmentos comienza con transferencia al PRPP del grupo amida de glutamina, catalizada por *glutamina: PRPP amidotransferasa*. El grupo amida desplaza al pirofosfato del carbono 1 de la ribosa y se forma 5-fosforribosilamina. El nitrógeno finalmente ocupará la posición 9 de la purina. La disposición espacial en carbono 1 se convierte en β, configuración propia de los nucleótidos naturales.



5-fosforribosil-1-pirofosfato



5-fosforribosil-1-amina

La inmediata hidrólisis del pirofosfato liberado hace a esta reacción prácticamente irreversible. El factor regulador más importante es el PRPP. La concentración de este compuesto en las células es 10 a 100 veces más baja que la K_m de la enzima. Por esta razón, los cambios en los niveles de PRPP producen modificaciones proporcionales de actividad de la transferasa.

La 5-fosforribosilamina reacciona con glicina y ATP para formar fosforribosil-glicinamida. Cataliza esta transferencia la *fosforribosilglicinamida sintetasa*.

5-Fosforribosilamina + Glicina + ATP →
→ 5-Fosforribosilglicinamida + ADP + P_i

La glicina incorporada en esta reacción aporta los carbonos 4 y 5 y el nitrógeno 7 de la purina. Los restantes átomos se agregan en etapas sucesivas hasta formar un nucleótido, ya que la ribosa-5-fosfato permanece unida al N 9 durante todo el proceso. Se obtiene ácido inosínico o inosina monofosfato (IMP), cuya base nitrogenada es hipoxantina. El carbono 6 de la hipoxantina de IMP es aminado por transferencia del grupo α-amina de aspartato para formar AMP; la hidrólisis de un enlace fosfato de GTP provee la energía necesaria.

En otra vía alternativa, la hipoxantina de IMP es oxidada a xantina y posteriormente aminada en carbono 2 por transferencia del grupo amida de glutamina; se obtiene ácido guanílico o guanosina monofosfato (GMP). La hidrólisis de ATP a AMP y PP_i suministra la energía para la transferencia del grupo $-NH_2$.

Regulación. La síntesis de nucleótidos purínicos es regulada por retroalimentación en varios niveles: a) Formación de PRPP. La fosforribosilpirofosfato sintetasa es inhibida por IMP, AMP y GMP, productos finales de la vía. De esta manera, cuando aumenta en el medio el nivel de esos nucleótidos se deprime la formación de PRPP. b) La etapa de PRPP a fosforribosilamina es el principal sitio de control de la síntesis de nucleótidos de purina. AMP, GMP e IMP actúan como efectores negativos de la glutamina: PRPP amidotransferasa. También son inhibidores ATP, ADP, GTP, GDP, ITP e IDP. Cada grupo de nucleótidos tiene sitios alostéricos diferentes en la enzima, razón por la cual la acción de varios de ellos es aditiva. c) A partir de IMP, la vía se bifurca. Uno de los caminos lleva a AMP, el otro a GMP. Las enzimas involucradas en la oxidación y aminación de IMP para generar GMP son inhibidas por GMP, mientras la aminación de IMP para formar AMP es deprimida por éste (fig. 18-3). d) La síntesis de AMP a partir de IMP utiliza GTP como proveedor de energía, mientras la de GMP usa ATP. Esto representa un dispositivo regulador para el funcionamiento equilibrado de los dos ramales finales de la vía. Un exceso de GTP favorece la producción del nucleótido de adenina, mientras un nivel elevado de ATP promueve la formación de GMP.

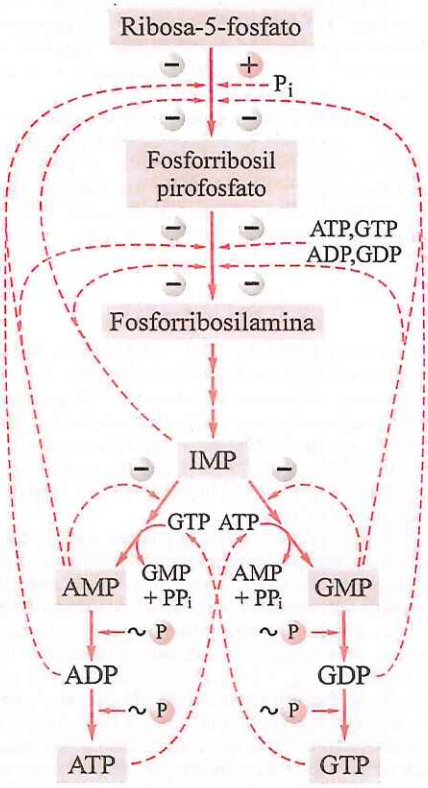


Fig. 18-3. Acciones regulatorias en la biosíntesis de purinas.

Vía de recuperación de purinas

El costo energético de la síntesis del núcleo purina es muy elevado (6 enlaces de alta energía por molécula de IMP). Por ello se han desarrollado vías más económicas, llamadas de *recuperación*, rescate o reutilización de bases; producen nucleótidos a partir de purinas procedentes de la degradación de ácidos nucleicos en tejidos, o de las absorbidas en intestino después de la digestión de alimentos. Hay mezcla de bases endógenas y exógenas, razón por la cual la separación metabólica referida anteriormente no es absoluta.

La adenina es convertida en ácido adenílico o adenosina monofosfato (AMP) por reacción con 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) catalizada por *adenina-fosforribosil transferasa* (APRT). El resto ribosa-5-fosfato se une por enlace N-glicosídico al N 9 de adenina para formar AMP.

$$\text{Adenina} + \text{PRPP} \xrightarrow[\text{transferasa}]{\text{Adeninafosforribosil}} \text{Acido adenílico (AMP)} + PP_i$$

En una reacción similar, hipoxantina y guanina son transformadas en los nucleótidos correspondientes, ácido inosínico o inosina monofosfato (IMP) y ácido guanílico o guanosina monofosfato (GMP), por acción de *hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa* (HGPRT).

$$\begin{matrix}\text{Hipoxantina} \\ \text{Guanina}\end{matrix} + \text{PRPP} \xrightarrow{\text{Hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa}} \begin{matrix}\text{Ácido inosínico (IMP)} \\ \text{Ácido guanílico (GMP)}\end{matrix} + PP_i$$

La actividad de HGPRT en la mayoría de las células es mucho más elevada que la de APRT.

El costo de esta recuperación de purinas es de 1 mol de ATP por mol de nucleótido. Se consume ATP en la generación de PRPP. Esto significa un ahorro de 5 moles de ATP con relación a la síntesis *de novo*.

Se ha descripto una enfermedad hereditaria, ligada al cromosoma X, en la cual falta hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa; es el síndrome de Lesch-Nyhan, caracterizado por sobreproducción de ácido úrico, retardo mental, espasticidad y otros síntomas neurológicos muy serios.

Catabolismo de purinas

La degradación de ADN y ARN en las células produce nucleótidos de desoxiadenosina, desoxiguanosina, adenosina y guanosina. En general, estos compuestos son sometidos a hidrólisis catalizada por nucleotidasas o fosfatasas existentes en las células, que dejan libres los nucleósidos adenosina y guanosina; la guanosina es degradada a guanina y pentosa.

Tanto la adenina como la guanina inicialmente sufren desaminación hidrolítica; la adenina es desaminada cuando está todavía unida a la pentosa, en forma de adenosina; en cambio, la guanina está libre.

Por acción de *adenosina desaminasa*, la adenosina se convierte en inosina, nucleósido de hipoxantina (fig. 18-4). Posteriormente, una reacción de fosforilación catalizada por *nucleósido fosforilasa* separa la inosina en hipoxantina y pentosafosfato. En la etapa siguiente, la hipoxantina se convierte en xantina por oxidación en el carbono 2. Cataliza la reacción la *xantina oxidasa*, enzima con molibdeno que utiliza oxígeno molecular; se libera peróxido de hidrógeno.

La guanina inicia su catabolismo por desaminación hidrolítica catalizada por *guanasa*; se produce xantina (fig. 18-4). Es decir, las vías catabólicas de adenina y guanina convergen en la formación de un intermediario común, la xantina.

Finalmente la xantina es oxidada en el carbono 8 por acción de *xantina oxidasa*, la misma enzima que cataliza la oxidación de hipoxantina. Se forma *ácido úrico*, producto terminal del catabolismo de bases púricas en el ser humano, que es un compuesto muy poco soluble en agua, excretado principalmente por orina. En otros animales existe *uricasa*, que cataliza la conversión de ácido úrico en un producto más hidrosoluble.

Un defecto genético que afecta la síntesis de adenosina desaminasa es causa de aproximadamente el 15% de casos de una enfermedad muy grave, la *inmunodeficiencia severa combinada*. Normalmente la enzima se encuentra en todos los

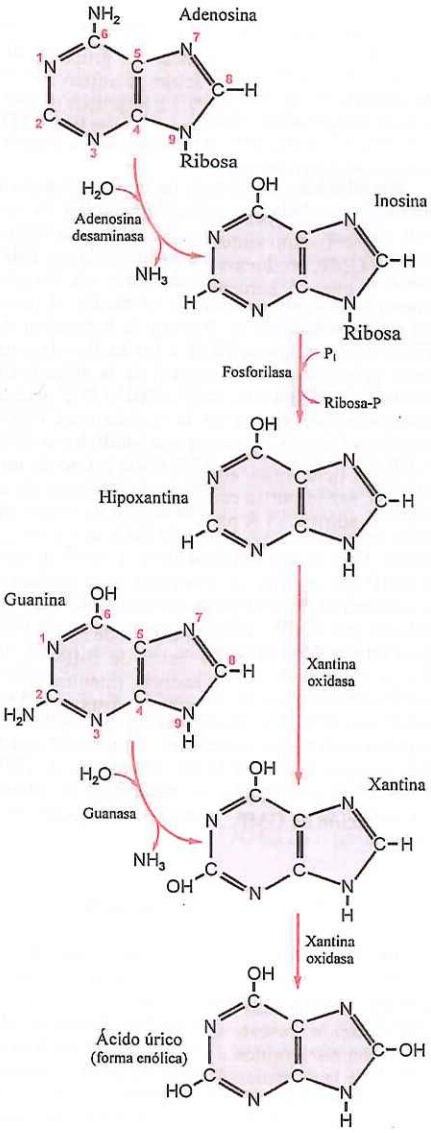


Fig. 18-4. Catabolismo de bases púricas.

tejidos, pero es particularmente abundante en los linfocitos T y B (pág. 662), razón por la cual estas células son las más afectadas por la falla enzimática. La causa más común de IDSC (45% de los

casos) es un defecto ligado al cromosoma X que resulta en la pérdida de la cadena γ del receptor de células T (ver Cap. 30).

Cuando la adenosina desaminasa falta, se acumula adenosina, que finalmente puede convertirse en ATP y dATP por acción de quinasas extracelulares. El aumento de los niveles de dATP inhibe la ribonucleótido reductasa y con ello la producción de los otros desoxirribonucleótidos y, por ende, la de ADN. Los niños afectados tienen serios defectos en su sistema inmunitario y son fácil presa de todo tipo de infecciones. Generalmente no sobreviven más allá de los dos años de edad. Esta enfermedad es la primera en la que se autorizó terapia génica; el tratamiento ofrece buenas perspectivas.

Otra enfermedad hereditaria relacionada con esta vía metabólica es la falta de xantina oxidasa. El cuadro es llamado *xantinuria*, pues los sujetos afectados eliminan xantina por orina y forman cálculos de esta sustancia en vías urinarias.

Ácido úrico

En el hombre, el producto final del catabolismo de purinas es el ácido úrico. Un adulto normal produce unos 500 mg de ácido úrico por día. Aproximadamente 80% de esa cantidad es excretado por orina; el resto se degrada y es eliminado como CO_2 y NH_3 o urea.

En el plasma normal, el ácido úrico alcanza una concentración de 4 a 6 mg por dL. Los varones tienen niveles 1 mg por dL más altos que las mujeres; esta diferencia desaparece después de los 45-50 años de edad.

El pK_a del grupo –OH unido al carbono 8 del ácido úrico tiene un valor de 5,75; al pH de la sangre normal, la mayor parte del ácido úrico libera el protón de ese grupo y se ioniza a urato. A pH 5,75 existen cantidades iguales de las formas protonada y desprotonada (ácido úrico y urato), mientras a pH menor predomina ácido úrico (no ionizado). Cuando la orina se acidifica, aumenta la proporción de ácido úrico y éste tiende a precipitar; en cambio, si se alcaliniza es posible vehiculizar mayor cantidad de este compuesto en forma de urato, diecisiete veces más soluble en agua.

El urato filtra en glomérulos renales y es parcialmente reabsorbido en túbulos proximal y distal. También es secretado en túbulo proximal y asa de Henle. Normalmente se eliminan, término medio, unos 400 mg cada 24 horas.

Existen fármacos que bloquean la reabsorción tubular de uratos y, por lo tanto, incrementan su eliminación por orina. Entre estos fármacos uricosúricos se cuentan salicilato, cincofeno y probenecid. La excreción urinaria de uratos también es aumentada por hormonas de corteza suprarrenal.

Cuando se ingieren dietas ricas en ácidos nucleicos aumenta el ingreso de purinas y, en consecuencia, se incrementa la producción de ácido úrico y la excreción de uratos por orina. Son ricos en nucleoproteínas y, por lo tanto, en bases púricas, carne, vísceras, tejidos glandulares, extracto de carne, legumbres, hongos y espinaca.

Gota

La máxima cantidad de urato que puede disolverse en plasma a 37°C es 7 mg por dL, razón por la cual cuando se excede este nivel los uratos tienden a precipitar.

La *gota* es una enfermedad caracterizada por niveles elevados de uratos en sangre (hiperuricemia) y en orina (uricosuria). Los uratos precipitan en el líquido sinovial de las articulaciones. La precipitación de uratos atrae neutrófilos hacia el área afectada que fagocitan los cristales formados e inician un proceso inflamatorio con liberación de citoquinas y especies reactivas de oxígeno. También aumenta la producción de lactato, lo que disminuye el pH y acentúa el aumento local y deposición de uratos. Se forman los llamados *tofos*, que son nódulos constituidos por la zona de inflamación que rodea a los cristales de uratos.

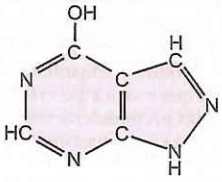
Son afectadas preferentemente las articulaciones interfalángicas y del metatarso, lo que produce artritis muy dolorosas. Es típica la localización en articulaciones del dedo gordo del pie. También se producen precipitados de uratos (tofos) en cartílagos (pabellón de la oreja).

La *gota primaria* es un trastorno metabólico de origen genético. Hay producción excesiva o excreción urinaria deficiente de ácido úrico. Se han identificado varias mutaciones ligadas al cromosoma X en el gen de la PRPP sintetasa que determinan la síntesis de una enzima con mayor actividad. En algunos casos presenta V_{max} elevada, o K_m disminuida para ribosa-5-fosfato, o es insensible a inhibición por retroalimentación. Cualquiera de estos defectos lleva a la producción en exceso de purinas y con ello al aumento de los niveles de ácido úrico en sangre. Deben estar también involucrados factores hormonales, pues la frecuencia de gota primaria es menor en el sexo femenino que en el masculino; en mujeres generalmente se produce después de la menopausia. Es muy rara en niños y adolescentes.

En otros casos, el defecto radica en el sistema responsable del transporte y secreción de uratos en túbulos renales. A esta forma se le llama *gota renal* para distinguirla de la otra que sería *metabólica*.

Existe una *gota secundaria* a las hiperuricemias que acompañan a la insuficincia renal crónica, leucemias y otros procesos con proliferación celular tratados con quimioterapia. Se produce frecuentemente en la ingesta excesiva de alcohol. También se observa hiperuricemia cuando hay producción exagerada de lactato y cuerpos cetónicos (acetoacetato y 3-hidroxibutirato), que compiten con los uratos por los sistemas de excreción en riñón.

Uno de los fármacos más efectivos para reducir niveles de ácido úrico es el *alopurinol* (fig. 18-5). En el organismo se convierte en oxipurina, estructuralmente similar a la hipoxantina y produce inhibición "suicida" de xantina oxidasa. La oxipurina se une al sitio activo y es oxidado a oxopurinol o aloxantina. Este compuesto permanece unido a la enzima y la bloquea; disminuye la producción de xantina y, por ende, de ácido úrico. Se acumula hipoxantina, más soluble, y por lo tanto con menos posibilidad de precipitar e iniciar inflamaciones. El alopurinol tiene también acción depresora de la síntesis de purinas. Otro fármaco, reductor de la producción de ácido úrico, inhibidor de la xantina oxidasa, es el febuxostat.



Alopurinol

Probenecid y sulfampirazona son fármacos que aumentan la excreción de uratos y ayudan a disminuir sus niveles en sangre.

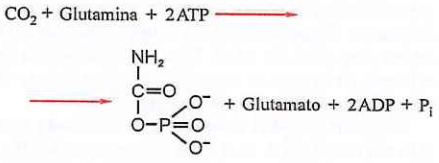
Si bien la hiperuricemia en la gota no es debida a las purinas ingresadas con la dieta, sino al aumento de producción endógena, es aconsejable la reducción del consumo de alimentos ricos en purinas para no contribuir con bases adicionales a la generación de ácido úrico.

Ya se ha mencionado la producción de hiperuricemia marcada en el síndrome de Lesch-Nyhan. En estos casos, la carencia de hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa determina incremento de PRPP en las células. Como el compuesto no puede ser utilizado en la recuperación de purinas, es derivado hacia la síntesis *de novo* de bases; el aumento en la producción de purinas incrementa su degradación y la formación de ácido úrico.

Biosíntesis de pirimidinas

Como la purina, el núcleo pirimidina se forma a partir de precursores relativamente simples: aspartato y carbamilfosfato. La figura 18-5 indica la contribución de ambos compuestos a la constitución del ciclo.

El primer paso es la formación de carbamilfosfato, catalizada por *carbamilfosfato sintetasa* 2 (CPS 2). Se incorpora un grupo $-NH_2$ procedente de la desaminación de glutamina.



Carbamilfosfato

La reacción es similar a la etapa inicial del ciclo de la urea. Sin embargo, existen diferencias importantes entre ambas. En las células, particularmente en hepatocitos, hay dos conjuntos (*pools*) separados de carbamilfosfato, uno mitocondrial y otro citosólico. El primero participa en síntesis de urea y el segundo en la de pirimidinas. Existen dos isozimas de carbamilfosfato sintetasa con diferente localización subcelular. La enzima mitocondrial o isozima 1 se encuentra principalmente en hepatocitos, requiere N-acetilglutamato como activador alostérico y utiliza como sustrato NH_3 de cualquier origen, más comúnmente derivado de la desaminación oxidativa del glutamato. La carbamilfosfato sintetasa citosólica o isozima 2, involucrada en la síntesis de pirimidinas, está presente en todas las células, no modifica su actividad por N-acetilglutamato; en cambio, es activada alostéricamente por ATP y PRPP, e inhibida por UTP. Sólo utiliza el grupo amida de glutamina como proveedor de nitrógeno.

La existencia de enzimas diferentes para síntesis de un metabolito intermediario común a dos vías distintas y la compartimentalización de éstas, permite su regulación independiente.

Fig. 18-5. Procedencia de los elementos del núcleo pirimidina. En negro, elementos procedentes de carbamilo, en rojo, de ácido aspártico.

El carbamilfosfato se combina con aspartato para formar carbamilaspartato. La reacción es catalizada por *aspartato transcarbamilasa*, enzima alostérica, principal sitio de regulación de esta vía.

El compuesto formado se cicliza por acción de *dihidro-orotasa*; posteriormente es convertido en ácido orótico. Las tres primeras enzimas de esta vía de síntesis (carbamilfosfato sintetasa 2, aspartato transcarbamilasa y dihidro-orotasa) se encuentran en dominios catalíticos distintos de una misma proteína multifuncional. El ácido orótico reacciona con 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) para formar una estructura nucleotídica. El pirofosfato es desplazado; queda ribosa-5-fosfato unida por enlace N-glicosídico a N 1 del anillo pirimidínico. Se forma orotato monofosfato (OMP) que luego se transforma por descarboxilación en ácido uridílico o uridina monofosfato (UMP). Las dos enzimas que convierten orotato en UMP (orotato-fosforribosil transferasa y OMP descarboxilasa) pertenecen a la misma proteína bifuncional.

Por cesión de dos fosfatos de alta energía al UMP éste se convierte en UTP. El carbono 4 del uracilo es aminado por transferencia del grupo amida de glutamina, para formar citidina trifosfato (CTP).

Otra vía lleva a la reducción del carbono 2' de la ribosa de UDP, que se convierte en desoxiuridina difosfato (dUDP); éste es desfosforilado a dUMP y metilado en carbono 5 del anillo pirimidina, para dar ácido desoxitimidílico o desoxitimidina monofosfato (dTMP). En la cesión del grupo metilo participa tetrahidrofolato. Es ésta la única reacción en la síntesis de bases pirimidínicas ligada a tetrahidrofolato. Por esta razón, la formación de dTMP es sensible a agentes antagonistas del ácido fólico.

La aspartato transcarbamilasa es una de las primeras enzimas en las que se describió regulación alostérica. Sustratos y nucleótidos de purinas actúan como moduladores positivos, mientras los nucleótidos de pirimidina, productos finales de la vía, se comportan como efectores negativos (fig. 18-6). La acción de los nucleótidos púricos sobre la formación de pirimidinas es importante, pues establece equilibrio en la producción de ambos tipos de nucleótidos, especialmente para la síntesis de ADN.

Hay semejanzas y diferencias entre los procesos de síntesis de purinas y pirimidinas. Como similitudes pueden anotarse las siguientes: a) La síntesis de ambos tipos de bases requiere amida de glutamina. b) En ambas vías un aminoácido es incorporado como "núcleo" del compuesto a sintetizar. En la formación del anillo purina, la glicina suministra dos carbonos y un nitrógeno; en la formación de pirimidina, el aspartato provee tres carbonos y un nitrógeno. c) Como para las purinas, existen vías de rescate o recuperación que reciclan pirimidinas procedentes de degradación de ácidos nucleicos. d) La síntesis es muy onerosa en términos de enlaces de alta energía. Cada molécula de UMP requiere inversión de 5 de ATP. Entre las diferencias, se citará una notable: en la síntesis de purinas el ensamble de fragmentos se hace desde el comienzo en unión a ribosilfosfato, mientras en la de pirimidinas, el ribosilfosfato es incorporado después que el anillo heterocíclico ha sido formado.

Aciduria orótica. Es una enfermedad genética que afecta a enzimas de la síntesis de pirimidinas o del ciclo de la urea. En algunos casos, la deficiencia radica en la proteína bifuncional responsable de la conversión de orotato en UMP. Los pacientes excretan ácido orótico por orina, padecen anemia megaloblástica y retardo del crecimiento. También se produce aciduria orótica cuando hay déficit de ornitina transcarbamilasa; en este caso se observa hiperamoniemia.

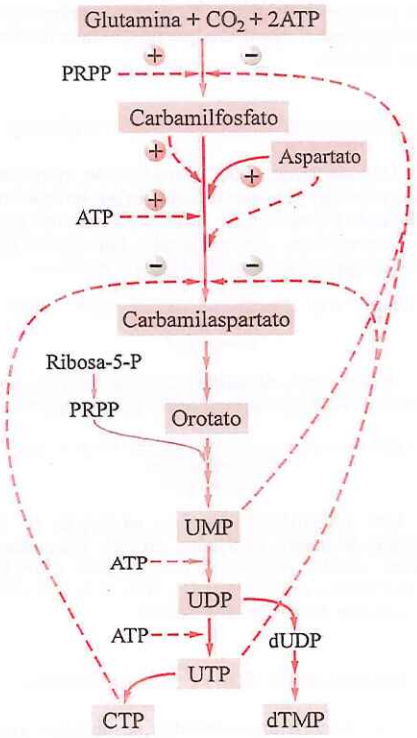


Fig. 18-6. Acciones regulatorias en la biosíntesis de pirimidinas.

Catabolismo de pirimidinas

Las bases pirimídicas son degradadas hasta productos solubles, fácilmente eliminados o utilizados por las células.

La citosina, por desaminación, es convertida en uracilo; éste recibe dos hidrógenos donados por NADPH para formar dihidrouracilo. Posteriormente, por hidrólisis y ruptura del anillo pirimídico, se producen β-alanina, CO_2 y NH_3 como productos finales.

La timina es hidrogenada a dihidrotimina en reacción ligada a NADPH. Luego el ciclo se abre y se producen β-aminoisobutirato, CO_2 y NH_3. Eventualmente, el β-aminoisobutirato se convierte en succinil-CoA, intermediario del ciclo del ácido cítrico.

En pacientes leucémicos y en los sometidos a tratamiento con rayos X, la degradación exagerada de ADN determina aumento de eliminación de β-aminoisobutirato.

En individuos de ascendencia china o japonesa se ha observado una excreción aumentada de β-amino-isobutirato. Es éste un carácter genéticamente transmitido que no produce trastornos clínicos.

Biosíntesis de nucleósidos di- y trifosfato

Una vez sintetizado un nucleósido monofosfato se le agregan grupos fosforilo por transferencia desde un nucleósido trifosfato. Estas reacciones, reversibles, son catalizadas por *nucleósido monofosfato* y *nucleósido difosfato quinasas*.

$$GMP + ATP \rightleftharpoons GDP + ADP$$

Nucleósido monofosfato quinasa, Mg^{2+}

El nucleósido difosfato reacciona con otra molécula de ATP para formar nucleósido trifosfato.

$$GDP + ATP \rightleftharpoons GTP + ADP$$

Nucleósido difosfato quinasa, Mg^{2+}

Los nucleósidos trifosfato participan en la síntesis de ácidos nucleicos. Si bien estas reacciones pueden generar ATP a partir de ADP, la fosforilación oxidativa (pág. 176) es la vía más importante de producción de ATP.

Biosíntesis de desoxirribonucleótidos

Los desoxirribonucleótidos se obtienen por reducción de ribosa ya incorporada en nucleótidos. Se utilizan como sustratos nucleósidos difosfato (ADP, GDP). La reacción es catalizada por *ribonucleósido difosfato reductasa*, complejo multienzimático presente en todas las células, activo sólo cuando se sintetiza ADN. El agente reductor es una proteína de molécula pequeña, *tiorredoxina*, con dos residuos cisteína próximos, cuyos sulfhidrilos ceden H. Otra enzima del complejo, *tiorredoxina reductasa*, dependiente de NADPH, regenera tiorredoxina reducida.

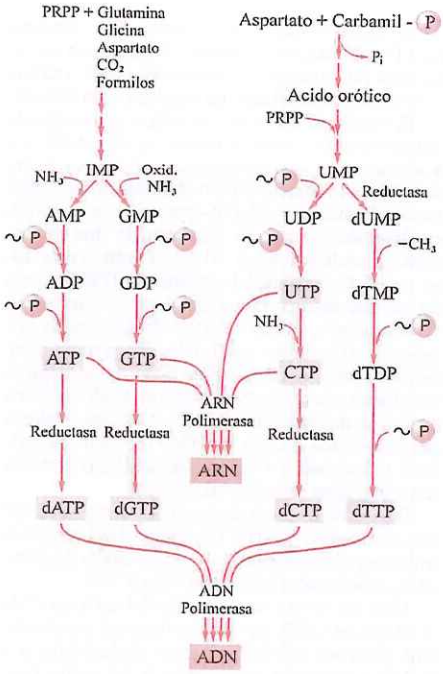


Fig. 18-7. Síntesis de ácidos nucleicos.

El proceso de síntesis de desoxirribonucleótidos es regulado para asegurar una producción balanceada. El ATP es activador alostérico; dATP, dGTP, dTTP y dCTP, por retroalimentación, deprimen específicamente su propia síntesis.

Aplicaciones farmacológicas

Se ha mencionado el uso de alopurinol, inhibidor de xantina oxidasa, en el tratamiento de la hiperuricemia. Existen otros fármacos desarrollados a partir del conocimiento de las vías metabólicas de bases púricas y pirimídicas. Varios de ellos son utilizados en el tratamiento de tumores malignos.

Una de las características de tejidos neoplásicos es su tendencia a la multiplicación celular incontrolada, lo cual implica gran actividad de síntesis de ácidos nucleicos y bases púricas y pirimídicas. Por esta razón, compuestos estructuralmente análogos a sustratos o metabolitos intermedios de vías de síntesis de bases nitrogenadas pueden deprimir la actividad mitótica actuando como inhibidores competitivos.

Entre este tipo de fármacos se cuentan la asazerina y la 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ambos análogos de glutamina, importante donante de nitrógeno en la síntesis de bases púricas y pirimídicas, en la formación de CTP a partir de UTP y de GMP a partir de XMP. La administración de esos antagonistas bloquea las etapas en las cuales participa glutamina.

Los llamados antifólicos, como metotrexato y aminopterina, son inhibidores competitivos de la dihidrofolato reductasa, que cataliza la formación de tetrahidrofolato. Este agente tiene un papel muy importante en la síntesis de purinas, pues transfiere restos monocarbonados; también es necesario para convertir dUMP en dTMP.

La 6-mercaptopurina, la 8-azaguanidina, el 5-fluorouracilo y otros compuestos análogos de bases púricas y pirimídicas son antagonistas metabólicos que frenan la multiplicación celular. Se utilizan estos agentes farmacológicos en el tratamiento de algunos tipos de tumores malignos.

La azidotimidina (AZT), cuya molécula tiene semejanza estructural con el nucleósido timidina, bloquea la síntesis de ADN por la transcriptasa inversa. Es usado en el tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) (pág. 690).

Tejidos normales con intensa actividad mitótica, particularmente el eritropoyético, a menudo resultan afectados por el tratamiento con estos fármacos. Por esta razón, su uso debe realizarse bajo estrecha vigilancia.

RESUMEN

El ser humano no depende de purinas y pirimidinas de la dieta para atender sus necesidades de síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos; las células producen bases nitrogenadas.

Biosíntesis de purinas. El anillo purina se sintetiza a partir de restos de diverso origen: C 4 y 5 y N 7 proceden de glicina; N 3 y 9, del grupo amida de glutamina; N 1, de aspartato; C 2 y 8, de restos formilo cedidos por tetrahidrofolato; C 6, de CO_2. El ensamble se realiza en unión con ribosa-5-P; al final se obtiene un nucleótido. Primero se forma 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) (fosforribosilpirofosfato sintetasa, enzima inhibida por producto final, AMP, GMP, IMP). Existe una vía de recuperación de purinas en la que intervienen adenina-fosforribosil transferasa e hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa.

Catabolismo de purinas. Los ácidos nucleicos son degradados a nucleótidos y nucleósidos. La adenosina es desaminada (adenosina desaminasa). La inosina formada es escindida por fosforilación (nucleósido fosforilasa) en hipoxantina y ribosa-P. Luego la hipoxantina es oxidada a xantina (xantina oxidasa). La guanosina es hidrolizada a guanina y ribosa. La guanina es desaminada a xantina (guanasa). La xantina formada tanto a partir de adenina como de guanina es oxidada a ácido úrico (xantina oxidasa). El ácido úrico es el producto terminal en el hombre. Es poco soluble y se excreta principalmente por orina. En plasma normal la concentración de ácido úrico es de 4 a 6 mg/dL. En algunas condiciones patológicas este valor aumenta. La *gota* es una enfermedad caracterizada por niveles elevados de uratos en sangre y orina. Precipitan uratos en articulaciones y se producen artritis muy dolorosas.

Biosíntesis de pirimidinas. El núcleo pirimidina se forma por unión de aspartato y carbamilfosfato. El carbamilfosfato es sintetizado a partir del grupo amida de glutamina y de CO_2 (carbamilfosfato sintetasa 2). La reacción de carbamilfosfato y aspartato forma carbamilaspartato (aspartato transcarbamilasa), el cual se cicliza y forma ácido orótico. La aspartato transcarbamilasa es el principal sitio regulatorio; es inhibida por productos finales de la vía (UTP, CTP).

Catabolismo de pirimidinas. Los productos de degradación de pirimidinas son solubles y fácilmente eliminados o utilizados. La citosina da β-alanina, CO_2 y NH_3. La timina da β-aminoisobutirato, CO_2 y NH_3. El β-aminoisobutirato se convierte en succinil-CoA.

Biosíntesis de nucleósidos di- y trifosfato. Se obtienen a partir de nucleósidos monofosfato por transferencia de fosforilos desde otros nucleósidos trifosfato (nucleósido quinasa).

Biosíntesis de desoxirribonucleótidos. La ribosa del nucleótido es reducida por ribonucleótido reductasa; participan tiorredoxina y NADPH.

BIBLIOGRAFÍA

Blanco A., Kremer R.D., Taleisnik S. (Eds.).(2000). *Inherited Metabolic Defects*, Academia Nacional de Ciencias, Córdoba.

Pang B. et al. (2012). Defects of purine nucleotide metabolism lead to substantial incorporation of xanthine and hypoxanthine into DNA and RNA. *Proceedings of the US National Academy of Sciences*, 109: 2319-2324.

Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D. (2001). *Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8va. Ed., McGraw Hill, Nueva York.

CAPÍTULO 19

Integración y regulación del metabolismo

INTEGRACIÓN METABÓLICA

La presentación de los metabolismos de carbohidratos, lípidos, aminoácidos, hemo, purinas y pirimidinas en capítulos separados tiene el riesgo de proyectar una imagen de compartimientos estancos, sin vinculación entre sí. Por ello es importante destacar que gran parte de las transformaciones de esos compuestos en el organismo están íntimamente relacionadas y presentan frecuentes interconexiones. Muchos sustratos de diverso origen y naturaleza convergen hacia las mismas vías metabólicas o dan productos finales idénticos; a su vez, estos productos, sean originados a partir de glúcidos, lípidos o aminoácidos pueden ser utilizados como materia prima para sintetizar compuestos muy diferentes.

Como ejemplo general de convergencia citaremos las vías catabólicas principales de hidratos de carbono, grasas y proteínas (fig. 19-1). Los componentes de los alimentos, sometidos a la hidrólisis digestiva generan sustancias más simples, que se absorben en intestino y pasan a la circulación. Cuando esas sustancias son degradadas en las células para obtener energía, pueden formar intermediarios comunes.

Fig. 19-1. Destino metabólico común de diferentes compuestos.

Los monosacáridos y el glicerol, a través de la glucólisis, dan piruvato, el cual se transforma en acetil-coenzima A. Los ácidos grasos, sometidos a β-oxidación, y los esqueletos carbonados de algunos aminoácidos producen también acetil-coenzima A. El acetato activo es un metabolito compartido por numerosas vías, que convergen para su oxidación final en el ciclo del ácido cítrico. Los carbonos de los aminoácidos, tanto los que dan acetil-CoA como los que son convertidos en intermediarios de ese ciclo, son oxidados a CO_2. A su vez, el acetil-CoA puede ser utilizado para la síntesis de ácidos grasos, colesterol y otras sustancias.

Los equivalentes de reducción (protones y electrones) sustraídos de distintos sustratos en el curso de esas oxidaciones ingresan en la cadena respiratoria, verdadera *vía final común*, hacia la cual se canalizan hidrógenos de muy diverso origen. Se forma H_2O y buena parte de la energía queda atrapada en las uniones de los fosfato γ y β del ATP.

Interconversión de hidratos de carbono, lípidos y aminoácidos

Distintos compuestos se interconvierten en el organismo. Los carbohidratos pueden transformarse en triacilgliceroles, pues en el curso de su metabolismo originan sustancias utilizables en la síntesis de grasas. La glucosa da acetil-CoA, principal precursor en la síntesis de ácidos grasos. El glicerol se forma a partir de un intermediario de la glucólisis, la dihidroxiacetonafosfato. Durante el metabolismo de la glucosa se producen también α-cetoácidos, fácilmente convertibles en aminoácidos por transaminación: el piruvato da alanina; el oxaloacetato, aspartato; el α-cetoglutarato, glutamato.

Después de desaminación, las cadenas carbonadas de aminoácidos pueden ser convertidas en glucosa o en cuerpos cetónicos. Según esas posibilidades los aminoácidos son clasificados en glucogénicos o cetogénicos.

El glicerol es el único integrante de lípidos potencialmente glucogénico. Los ácidos grasos se oxidan a acetil-CoA, no glucogénico.

La figura 19-2 es un esquema muy simple de interconexiones de vías metabólicas. En él puede comprobarse que algunos metabolitos, por ejemplo glucosa-6-fosfato, piruvato y acetil-coenzima A, son verdaderas encrucijadas; a ellos convergen y de ellos parten diversas vías o caminos metabólicos.

Alternativas metabólicas. Citaremos ejemplos de las vías posibles para algunos sustratos.

Glucosa-6-fosfato: a) glucólisis, b) hidrólisis a glucosa libre, c) incorporación a glucógeno, d) vía de pentosa fosfato. En algunas etapas de cada una de estas vías surgen nuevas alternativas, con otras posibilidades de transformación.

Piruvato: a) descarboxilación a acetil-CoA y todas las posibilidades metabólicas de éste, b) glucosa o glucógeno por la vía gluconeogénica, c) transaminación para dar alanina, d) reducción a lactato.

Acetil-CoA: a) oxidación en el ciclo del ácido cítrico con producción de energía utilizable, b) síntesis de ácidos grasos, c) síntesis de colesterol, d) síntesis de cuerpos cetónicos, e) incorporación en moléculas más complejas (acetilaciones).

Tirosina: a) síntesis de proteínas, b) síntesis de hormona tiroidea, c) síntesis de catecolaminas (dopamina, noradrenalina, adrenalina), d) síntesis de melanina, e) formación de fenoles, f) oxidación total a CO_2 y H_2O, con producción de energía, g) formación de glucosa (gluconeogénesis), h) formación de cuerpos cetónicos.

Glicina: a) síntesis de proteínas, b) síntesis de creatina, c) síntesis de glutatión, d) síntesis de hemo, e) síntesis de purinas, f) conjugación con ácidos biliares (ácido glicocólico), g) reacciones de desintoxicación (ej.: con ácido benzoico forma de ácido hipúrico), h) producción de restos monocarbonados (formilo) que participan en numerosas reacciones de síntesis, i) conversión en serina, j) formación de piruvato, con todas las posibilidades de éste, k) transaminación.

Frente a esta complejidad de las redes metabólicas y a las múltiples posibilidades de transformación de algunos sustratos, es realmente sorprendente que, en condiciones normales, el sistema funcione armónicamente y las cantidades de productos finales se adecuen a las necesidades del organismo.

Es necesario admitir la existencia de mecanismos de regulación dotados de una extraordinaria eficiencia. En efecto, existen dispositivos de control que modulan los flujos metabólicos en dirección y magnitud ajustadas a los requerimientos.

REGULACIÓN METABÓLICA

El funcionamiento de una vía metabólica exige la presencia en la célula de todas las enzimas que catalizan las reacciones correspondientes y de los sustratos alimentadores.

El nivel de actividad de las enzimas debe ser regulado para mantener concentraciones relativamente constantes de los metabolitos intermedios (generalmente en escalas que van de micro a milimolar). Por otra parte, la magnitud del flujo de metabolitos en cada vía es controlada a fin de adaptarlo a las fluctuaciones de la oferta de sustrato o de la demanda de productos.

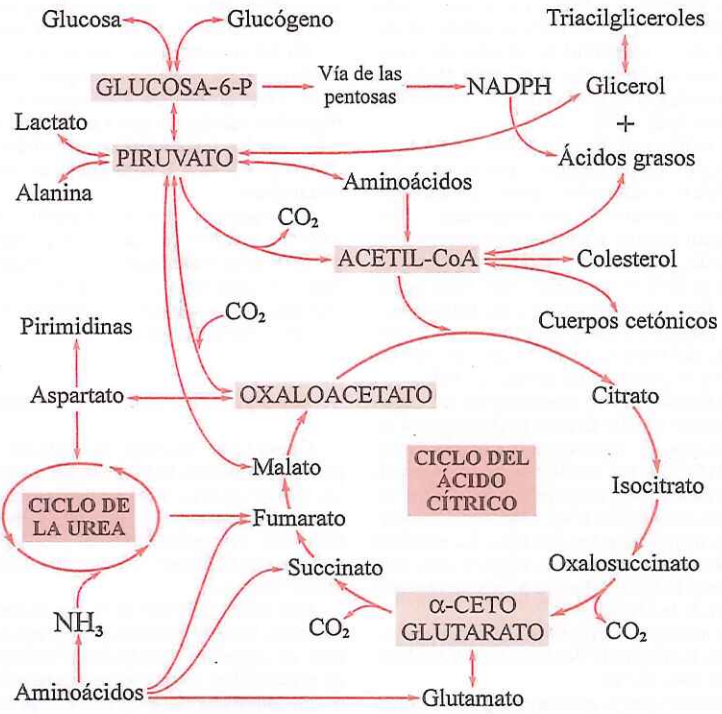


Fig. 19-2. Ejemplos de interrelación de vías metabólicas.

La actividad de las enzimas puede modificarse por dos tipos de mecanismos: 1) modulación de la actividad de enzimas preexistentes y 2) aumento o disminución del número de moléculas de enzima.

1. Modificación de la actividad de enzimas preexistentes. a) El tipo más simple de regulación está relacionado con la cantidad de sustrato en el medio. Si el nivel de éste es cercano o inferior al valor de la K_m de la enzima, la velocidad de reacción está directamente relacionada con la concentración de sustrato.

b) Otro mecanismo importante de control se efectúa por medio de *metabolitos regulatorios*, los modificadores, moduladores o efectores alostéricos (pág. 157). Al unirse a la enzima, estas sustancias producen cambios en la afinidad por el sustrato. Cuando aumentan la afinidad son modificadores positivos; en caso contrario, se trata de efectores negativos.

c) La actividad de algunas enzimas es modificada por unión covalente de ciertos grupos químicos. Por ejemplo, adición de fosfatos catalizada por quinasas.

Los tipos de acciones regulatorias mencionadas son de respuesta rápida. Las descriptas en las secciones a) y b) se manifiestan casi de inmediato (no más de 2 o 3 segundos); la modificación covalente, en pocos minutos.

2. Aumento o disminución del número de moléculas de enzima. La cantidad de enzima presente en el medio y su actividad están directamente relacionadas. El número de moléculas de una enzima en la célula en un momento dado depende del balance entre síntesis y degradación.

a) *Síntesis de proteína.* La regulación de la síntesis de enzimas se ejerce principalmente a nivel de la transcripción, es decir, de la transferencia de la información contenida en el ADN a moléculas de ARN mensajero (págs. 423 y 468). También es posible el control a nivel de la traducción, esto es, la conversión del mensaje del ARNm en la secuencia específica de aminoácidos de la proteína (págs. 440 y 447). Los mecanismos de regulación de la síntesis de proteínas son de respuesta más lenta que los descriptos anteriormente.

b) *Degradación proteica.* La concentración de una determinada proteína en la célula no depende sólo de la magnitud de su síntesis. También debe tenerse en cuenta el proceso de degradación proteínica, a cargo de enzimas hidrolíticas intracelulares (pág. 328).

Las proteínas cumplen un "ciclo vital" en la célula. Después de un tiempo, variable para distintas proteínas y diferentes tejidos, las moléculas son descompuestas en sus aminoácidos. Las enzimas están sujetas a permanente renovación; su vida media, es decir, el tiempo que tarda en degradarse el 50% de sus moléculas, varía desde minutos a días. Los mecanismos de degradación proteínica juegan un papel importante en la determinación del número de moléculas de enzima existentes en la célula en un momento dado.

Generalidades sobre mecanismos de regulación. Durante mucho tiempo la descripción de los mecanismos de regulación y control metabólico ha reflejado los resultados de estudios en enzimas aisladas o en preparaciones *in vitro* no exactamente asimilables a los sistemas metabólicos de organismos intactos. De aquellos estudios se extrapolaron las siguientes conclusiones, que han dominado la interpretación de los fenómenos en esta área de la bioquímica:

a) Existen etapas "*limitantes*", de cuya velocidad depende la magnitud del flujo de metabolitos a lo largo de toda la vía.

b) Es común que la primera etapa, así como aquellas en las cuales la vía se bifurca hacia destinos diferentes, o las reacciones fuertemente desplazadas en un sentido, sean *regulatorias* y graviten decisivamente en la actividad total de un proceso metabólico.

c) Frecuentemente el producto final de una vía ejerce acciones de *retroalimentación* (*feedback*) sobre una enzima "clave" al comienzo de la serie de reacciones y controla la magnitud de su propia síntesis.

d) La existencia de *isozimas* con propiedades catalíticas o localización subcelular diferentes, que catalizan la misma reacción en vías metabólicas distintas, permiten su regulación independiente.

Algunas de estas afirmaciones siguen siendo válidas, pero otras, especialmente la existencia de etapas limitantes y la relación directa entre cambios de actividad de enzimas "clave" y cuantía del flujo total de una vía metabólica, son actualmente cuestionadas. Evidencias obtenidas mediante estudios cuantitativos del flujo de metabolitos en sistemas complejos indican que, si bien algunas enzimas tienen mayor influencia relativa que otras en el comportamiento total de una vía, éste es resultante de la contribución de varias de las enzimas participantes, especialmente aquellas que catalizan reacciones más alejadas del equilibrio.

En las secciones siguientes se describen mecanismos de regulación de algunas vías metabólicas. Parte de los datos presentados podrían ser objetados aduciendo que los diseños experimentales con los cuales fueron obtenidos no reproducen la enorme complejidad de los sistemas metabólicos.

No obstante, pese a sus limitaciones, la información existente puede ser considerada una primera aproximación para comprender los fenómenos regulatorios. Sin duda, nuevas evidencias seguirán acumulándose y ayudarán a perfeccionar los conocimientos en este campo.

Ejemplos de regulación metabólica

Como se ha indicado en capítulos anteriores, para el glucógeno, la glucosa y los ácidos grasos, las vías de síntesis y las de degradación recorren caminos diferentes. Algunas de las reacciones de esas vías son prácticamente irreversibles y requieren catalizadores distintos para transcurrir en un sentido u otro.

Esta diferenciación entre vías anabólicas y catabólicas tiene importancia fisiológica, pues permite al organismo controlar el sentido del flujo de metabolitos. Para ello se modula la actividad o concentración de enzimas comprometidas en reacciones unidireccionales.

Por lo general, los factores estimulantes de una vía anabólica deprimen simultáneamente la vía catabólica correspondiente o viceversa, lo cual permite no sólo regular su funcionamiento según las necesidades del organismo, sino asegurar la utilización de los recursos energéticos con eficiencia. Si no existiesen estos controles, se producirían ciclos metabólicos inútiles (*ciclos fútiles*), con despilfarro de energía.

Sin embargo, en ciertos casos la operación de ciclos fútiles puede cumplir un papel funcional, como veremos más adelante.

Los siguientes ejemplos dan idea del funcionamiento de sistemas reguladores.

Regulación de la síntesis y degradación de glucógeno

Con glucosa-1-fosfato como sustrato inicial, la síntesis de glucógeno consume un mol de ATP por mol de glucosa incorporada en el polímero. El ATP es necesario para regenerar UTP a partir del UDP liberado en la síntesis. La glucogenólisis

genera glucosa-1-fosfato sin producir energía. Si no hubiese control alguno, en un tejido dotado de todas las enzimas de las vías de síntesis y degradación, se establecería un ciclo fútil; de glucosa-1-fosfato a glucógeno y de éste a glucosa-1-fosfato en forma continua, con el consiguiente gasto improductivo de energía, pues cada vuelta exigiría hidrólisis de UTP a UDP y P_i.

En condiciones normales, el funcionamiento de tal ciclo es regulado. La síntesis de glucógeno se activa cuando se dispone de oferta abundante de glucosa y suficiente energía en forma de ATP. La degradación es estimulada en el hígado cuando disminuye el nivel de glucosa en sangre y debe atenderse la demanda de combustible de los tejidos. La regulación de ambos procesos es coordinada; en general, condiciones que promueven la síntesis de glucógeno inhiben la degradación y viceversa.

Glucogenólisis

La enzima regulatoria más importante en la degradación es la *glucógeno fosforilasa*, comúnmente designada sólo *fosforilasa*.

En hígado y músculo, que contienen las mayores reservas de glucógeno del organismo, la enzima se encuentra en dos formas, inactiva o *b* y activa o *a*.

La glucógeno fosforilasa muscular es una proteína diferente de la hepática, son isozimas sintetizadas bajo control de genes distintos. Sus propiedades no son exactamente iguales, pero el mecanismo de regulación es semejante; ambas son sensibles a modificación covalente y a efectores alostéricos.

La fosforilasa *b*, tanto en músculo como en hígado, es estimulada por adición de fosfato en unión éster con el hidroxilo de un resto serina en cada una de sus dos subunidades constituyentes. Esta fosforilación es catalizada por *fosforilasa b quinasa* activa, que transfiere restos fosfato de ATP y forma glucógeno fosforilasa *a*.

$$\underset{\text{(inactiva)}}{\text{Fosforilasa } b} + 2\text{ATP} \xrightarrow[\text{quinasa}]{\text{Fosforilasa}} \underset{\text{(activa)}}{\text{Fosforilasa } a} + 2\text{ADP}$$

La inactivación de fosforilasa *a* se produce por hidrólisis de los enlaces entre los grupos fosforilo y serina, promovida por *proteína* fosforilasa *a* fosfatasa o proteína fosfatasa 1. La glucógeno fosforilasa vuelve a su forma *b*.

$$\text{Fosforilasa } a \xrightarrow{\text{Fosfatasa}} \text{Fosforilasa } b + 2P_i$$

La activación de glucógeno fosforilasa, ejemplo de regulación de enzimas por modificación covalente, es el resultado de una serie de reacciones escalonadas o "en cascada" en la cual el producto de cada reacción actúa como activador de la siguiente etapa. La figura 19-3 indica la serie de reacciones involucradas en la activación de la glucógeno fosforilasa. El proceso es iniciado por hormonas: adrenalina en músculo y glucagón en hígado. Al fijarse la hormona a receptores específicos de la membrana celular, activa una enzima llamada *adenilato ciclasa* (pág. 494). En el capítulo 24 se volverá sobre este tema y se analizará el mecanismo de acción de las hormonas.

La adenilato ciclasa cataliza la conversión de ATP intracelular en adenosina monofosfato-3',5'-cíclico (AMP cíclico, pág. 131). El AMP-3',5'-cíclico actúa como intermediario químico de muchas hormonas; si consideramos la hormona como "primer mensajero", el AMP cíclico sería el "segundo mensajero" en el sistema de señales químicas puesto en marcha por la llegada de la hormona.

El aumento del nivel de AMP-3',5'-cíclico en el citosol activa la *proteína quinasa A* (para más detalles véase págs. 493 a 496). La proteína quinasa A transfiere fosfato al –OH de un resto serina de la *fosforilasa b quinasa b o inactiva*. Esta enzima también se encuentra en dos formas, *a* y *b*; en su estado desfosforilado (*b*) es inactiva. La fosforilasa *b* quinasa activada (*a*), a su vez, cataliza la transferencia de fosfato de ATP a glucógeno fosforilasa *b* y la transforma en *a*, que inicia la degradación de glucógeno a glucosa-l-fosfato (fig. 19-3).

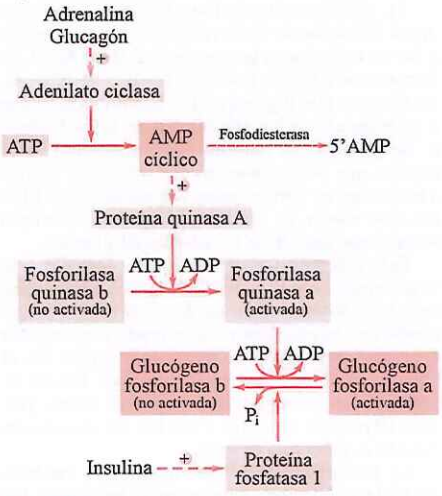


Fig. 19-3. Mecanismo "en cascada" de activación de glucógeno fosforilasa.

Dispositivos "en cascada" de este tipo producen gran amplificación de la respuesta. Una señal iniciada por pocas moléculas de hormona promueve la activación o producción de gran número de moléculas efectoras finales.

Como toda sustancia de gran actividad fisiológica, el AMP cíclico debe ser rápidamente degradado. Para ello existe en el citosol *fosfodiesterasa*, que cataliza la hidrólisis de la unión éster entre fosfato e hidroxilo del carbono 3 de la ribosa; el AMP-3',5'-cíclico se convierte en 5'-AMP, sin actividad.

La fosforilasa *a* es inactivada por una *fosforilasa a fosfatasa*, también llamada *fosfoproteína fosfatasa 1* (PP1), que separa los grupos fosforilos de la fosforilasa y la convierte en su forma inactiva, fosforilasa *b*.

Además de modificación covalente, la glucógeno fosforilasa es pasible de modulación alostérica.

Durante un ejercicio brusco e intenso, en músculo disminuye rápidamente la concentración intracelular de ATP y aumentan las de ADP y AMP. El AMP actúa como efector alostérico sobre la glucógeno fosforilasa *b*; cambia su conformación y la torna activa. El ATP y la glucosa-6-fosfato (G-6-P), en cambio, son efectores negativos de la enzima. En el músculo en reposo, la concentración de ATP es alta; casi toda la glucógeno fosforilasa *b* se mantiene inactiva. La fosforilasa *a* (fosforilada) es activa cualesquiera sean los niveles de AMP, ATP y G-6-P.

La glucógeno fosforilasa hepática tiene conducta diferente de la de músculo. No es sensible a las variaciones en la concentración de AMP. La forma *a* es inhibida por altos niveles de glucosa. La glucosa que ingresa en los hepatocitos se une a un sitio alostérico inhibitorio de la fosforilasa *a*. Se produce un cambio conformacional de la enzima que deja expuestos los fosforilos unidos a restos serina y los expone a la acción de la PP1. De este modo, la misma glucógeno fosforilasa actúa como sensor de los niveles de glucosa.

Esta diferencia entre músculo e hígado está relacionada con el papel de la glucogenólisis en cada uno de esos órganos. En el primero, la degradación de glucógeno es activada para atender necesidades energéticas del propio tejido. En el hígado, la glucosa no es la principal fuente de energía. La glucogenólisis hepática forma glucosa libre para exportar a tejidos extrahepáticos cuando la glucemia es baja.

La fosforilasa *b* quinasa inactiva es también activada alostéricamente cuando aumentan los niveles de Ca^{2+}. Una de las subunidades constituyentes de la enzima es calmodulina, proteína que fija calcio y promueve la activación. Este mecanismo tiene importancia fisiológica; la contracción muscular es iniciada por aumento brusco de la concentración de Ca^{2+} en el citosol. De esta manera, el incremento de Ca^{2+}, que es la señal desencadenante de la contracción, al mismo tiempo favorece la degradación de glucógeno para suministrar el combustible necesario.

Glucogenogénesis

El proceso de síntesis de glucógeno se regula fundamentalmente por modulación de la actividad de la *glucógeno sintasa*. Esta enzima existe en dos formas, activa o *a*, desfosforilada, e inactiva o *b*, fosforilada. Es regulada por modificación covalente, en sentido inverso al de la glucógeno fosforilasa.

La *proteína fosfatasa 1* (PP1), cataliza la conversión de la forma *b* de glucógeno sintasa en forma *a*, y la inactivación de glucógeno fosforilasa y fosforilasa quinasa. A su vez, la PP1 es activa cuando está desfosforilada.

La inactivación de la glucógeno sintasa se produce por reacciones en cascada iniciadas por hormonas, análogas a las de activación de glucógeno fosforilasa. La unión de adrenalina o glucagón a receptores específicos en la membrana de células musculares o hepáticas respectivamente, produce activación de la adenilato ciclasa, que cataliza la formación de AMP-3',5'-cíclico a partir de ATP. El AMP cíclico activa la proteína quinasa A, que fosforila e inactiva la glucógeno sintasa *a* y la proteína fosfatasa 1 (fig. 19-4). Existe también un mecanismo indirecto de inhibición de la PP1 catalizado por proteína quinasa A; es la activación, por fosforilación, de un inhibidor endógeno (I-1) de PP1.

Otra enzima, llamada *glucógeno sintasa quinasa 3* (GSK-3) y quinasas activadas por Ca^{2+} también fosforilan a la glucógeno sintasa. Una quinasa estimulada por insulina, la PKB o AKT, inhibe a la GSK-3 y contribuye a mantener activa a la glucógeno sintasa. La glucosa-6-fosfato actúa como efector alostérico positivo de la forma fosforilada de la enzima, normalmente inactiva. Por otra parte, el glucógeno, producto final de la vía, ejerce acción inhibitoria directa sobre la sintasa *a* (fig. 19-5).

A los mecanismos mencionados debe agregarse el importante papel de la *glucoquinasa* en la regulación de la glucogenogénesis en hígado. Esta enzima cataliza el primer paso de fosforilación de glucosa para formar glucosa-

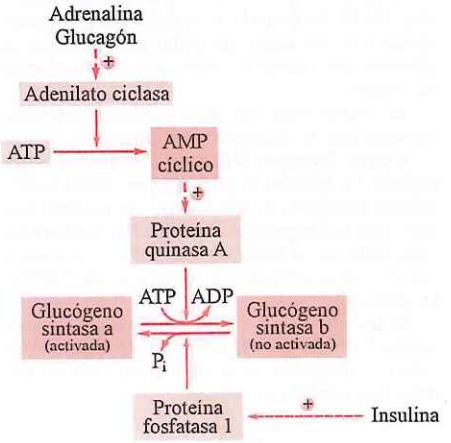


Fig. 19-4. Mecanismo de activación-inactivación de glucógeno sintasa.

6-fosfato; tiene elevada K_m para glucosa. Por esta razón, su actividad sólo alcanza valores fisiológicamente significativos cuando la oferta de glucosa es abundante; por ejemplo, después de una comida rica en carbohidratos. La glucosa-6-P activa alostéricamente a la glucógeno sintasa.

En ayunas, la mayor parte de la glucoquinasa permanece "secuestrada" en el núcleo de los hepatocitos, unida a una proteína regulatoria que la mantiene en estado inactivo. Después de las comidas, la llegada de glucosa aumenta, la glucoquinasa se separa de la proteína regulatoria y es transferida al citoplasma. La activación de la glucoquinasa aumenta la concentración de G-6-P. Este metabolito, actuando sinergísticamente con glucosa, promueve la desfosforilación (inactivación) de glucógeno fosforilasa y la activación (también por desfosforilación) de glucógeno sintasa.

Regulación de la glucólisis y la gluconeogénesis

Tres etapas de la vía de Embden-Meyerhof son reacciones fuertemente exergónicas, fisiológicamente irreversibles. En el camino inverso, de gluconeogénesis, esas etapas son catalizadas por enzimas diferentes de las glucolíticas. En ellas se ejercen acciones reguladoras del funcionamiento de ambos procesos.

Además, la intensidad de la glucólisis depende de la disponibilidad de sustrato y del estado redox de la célula. Se requieren glucosa, ADP, P_i y NAD^+. El proceso general es controlado en parte por los valores de las relaciones NADH/NAD^+ y lactato/piruvato. Estos, a su vez, dependen del aporte de oxígeno y del funcionamiento de la cadena respiratoria.

Etapa glucosa–glucosa-6-fosfato. Si no fuesen controladas, la reacción de fosforilación de

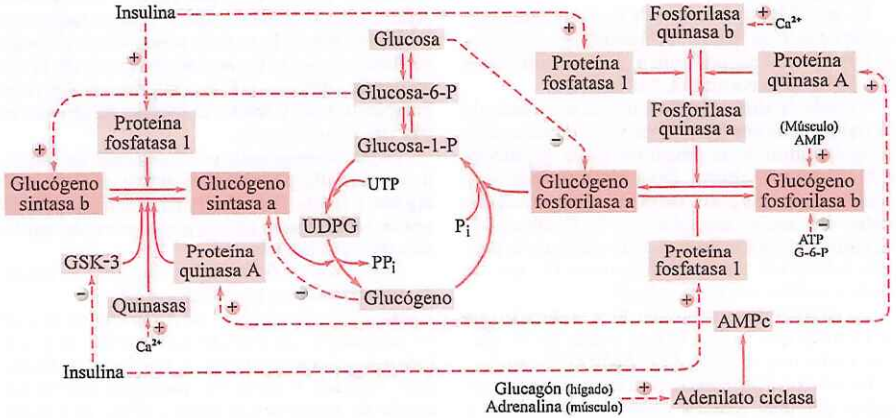


Fig. 19-5. Acciones regulatorias de la síntesis y degradación de glucógeno. + y - indican acción activadora e inhibidora respectivamente.

glucosa y su inversa, la hidrólisis de G-6-P, establecerían el siguiente *ciclo de sustrato*:

$$\text{Glucosa} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Hexoquinasa}} \text{Glucosa-6-P} + \text{ADP}$$

$$\text{Glucosa-6-P} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Glucosa-6-P fosfatasa}} \text{Glucosa} + \text{P}_i$$

El resultado neto de este ciclo de sustrato es:

$$\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$$

es decir, pérdida de un enlace fosfato de alta energía.

Por esta razón, a estos ciclos se los ha llamado *fútiles*. Sin embargo, algunos ciclos de sustrato cumplen un papel funcional; pequeños cambios de actividad en una o ambas enzimas producen marcado efecto en el flujo de metabolitos en uno u otro sentido.

Las *hexoquinasas* responsables de la formación de G-6-P en la gran mayoría de los tejidos tienen gran afinidad por la glucosa. A las concentraciones normales de glucosa trabajan prácticamente a su V_{max}. Las hexoquinasas están sujetas a regulación por producto; la G-6-P actúa como inhibidor temporario, reversible. El ATP contrarresta esta acción inhibitoria de la glucosa-6-fosfato (fig. 19-6).

La *glucoquinasa* o hexoquinasa IV cataliza la reacción en hígado y células β del páncreas. Tiene una K_m elevada, de modo que aun las más altas concentraciones de glucosa habituales en las células no alcanzan a saturarla. Por esta razón, la actividad de glucoquinasa es regulada por los niveles de glucosa, no es inhibida por su producto y puede continuar actuando a concentraciones de G-6-P que frenan totalmente la actividad de las otras hexoquinasas.

Es inhibida por la unión de una proteína regulatoria específica que la "secuestra" en el núcleo. La fijación de esta proteína a la glucoquinasa es más fuerte en presencia de fructosa-6-P.

Cuando la glucemia aumenta, la eficiencia de los transportadores GLUT2 en la membrana rápidamente equilibra las concentraciones de glucosa en la sangre y el citosol. De aquí la glucosa pasa fácilmente por los poros de la membrana nuclear; dentro del núcleo compite con la fructosa-6-P, disminuye la acción de ésta en la unión de la proteína inhibitoria con la hexoquinasa IV, que se libera y vuelve, activa, al citosol.

La síntesis de glucoquinasa es inducida por los factores que exigen mayor consumo de glucosa, como una relación ATP/AMP disminuida.

La *glucosa-6-fosfato fosfatasa*, presente en tejidos gluconeogénicos como hígado, riñón e intestino, es pasible de regulación por producto: la glucosa y el P_i actúan como inhibidores (fig. 19-6). Su síntesis es estimulada por condiciones que reclaman aumentar el suministro de glucosa, por ejemplo, bajos niveles de glucosa en sangre.

El control hormonal de la producción de estas enzimas será analizado en el capítulo 25.

Etapa fructosa-6-fosfato–fructosa-1,6-bisfosfato. La glucosa-6-fosfato tiene varias posibilidades metabólicas: glucólisis, vía pentosa fosfato, glucogenogénesis. La reacción irreversible catalizada por la fosfofructoquinasa 1 es la etapa que decide en definitiva el ingreso de la G-6-P en la glucólisis.

Si las reacciones catalizadas por *fosfofructoquinasa 1* y *fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa* no fuesen controladas, se produciría un ciclo de sustrato, con pérdida de energía.

$$\text{Fructosa-6-P} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Fosfofructoquinasa}} \text{Fructosa-1,6-bisP} + \text{ADP}$$

$$\text{Fructosa-1,6-bisP} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Fructosa-1,6-bisP fosfatasa}} \text{Fructosa-6-P} + \text{P}_i$$

La suma de ambas reacciones da:

$$\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$$

Las enzimas comprendidas en esta etapa juegan un papel muy importante en la regulación de la glucólisis y la gluconeogénesis.

En músculo y cerebro la glucólisis es regulada de acuerdo con la demanda de energía de las células, principalmente a través de efectores alostéricos de la *fosfofructoquinasa 1* que modifican el valor de su K_m para fructosa-6-fosfato. Esta enzima es el principal sitio de modulación de la glucólisis. Es activada por AMP y P_i, mientras ATP y citrato actúan como efectores negativos. La inhibición de la enzima produce acumulación de metabolitos de las etapas anteriores de la vía, entre ellos glucosa-6-P, que deprime la actividad de hexoquinasa y reduce el ingreso de glucosa en sus vías de utilización.

La gluconeogénesis prácticamente no funciona en músculo y cerebro; es activa en cambio en hígado y riñón. Por ello, la modulación simultánea de esta etapa en ambos sentidos es casi exclusiva de estos tejidos.

La *fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa* es inhibida alostéricamente por AMP y ADP.

En células hepáticas y de otros tejidos se aisló un compuesto con potente acción sobre la glucólisis y la gluconeogénesis, la *fructosa-2,6-bisfosfato*, formada a partir de fructosa-6-fosfato por acción de *fosfofructoquinasa 2* (PFK 2) e hidrolizado de vuelta a F-6-P por la *fructosa-2,6-bis-*

fosfato fosfatasa 2 (FBPasa 2). PFK 2 y FBPasa 2 son diferentes de FPK 1 y FBPasa 1; pertenecen a una proteína bifuncional con dos sitios activos, regulada por fosforilación/desfosforilación. La desfosforilación activa PFK2 e inhibe FBPasa2.

La fructosa-2,6-bisfosfato es un poderoso activador de la fosfofructoquinasa 1 e inhibidor de fructosa-1,6-bisP fosfatasa 1 (fig. 19-6). Modula la actividad de la fosfofructoquinasa 1 por diversas acciones que modifican propiedades cinéticas de la enzima: a) disminuye la K_m para fructosa-6-fosfato, b) aumenta la constante de asociación (K_a) para AMP, de modo que éste resulta un activador más eficiente, c) incrementa la constante de inhibición (K_i) para ATP, es decir, disminuye la capacidad de este efector como depresor de la enzima.

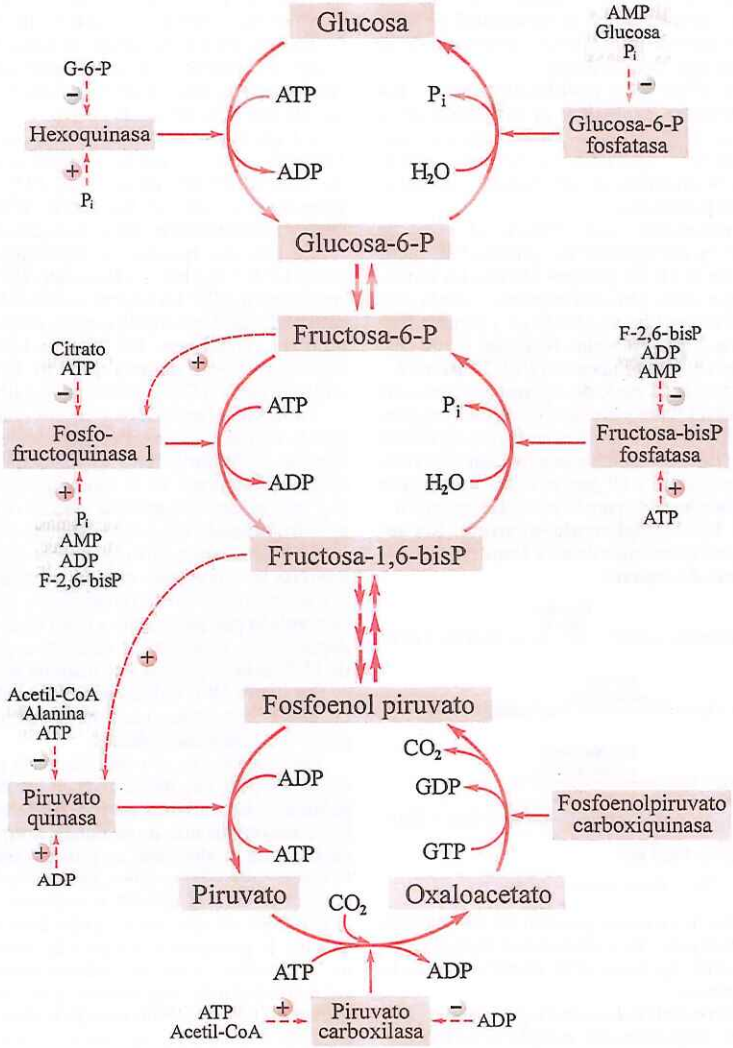


Fig. 19-6. Acciones regulatorias de la glucólisis y gluconeogénesis.

El glucagón, hormona secretada por el páncreas cuando la glucemia disminuye, actúa sobre el hígado por un mecanismo dependiente de AMP-3',5'-cíclico; produce disminución de fructosa-2,6-bisfosfato; en consecuencia, deprime la glucólisis y activa la gluconeogénesis. La insulina tiene un efecto opuesto.

El aumento de fructosa-2,6-bisfosfato representa una señal intracelular indicadora de elevados niveles de glucosa en sangre. La respuesta adecuada a esta situación es incremento de utilización de glucosa (glucólisis) y detención de su producción (gluconeogénesis).

La activación de la fosfofructoquinasa 1 por AMP y fructosa-2,6-bisP y la inhibición de la fructosa-1,6-bisP fosfatasa por los mismos compuestos establece un control direccional; simultáneamente la glucólisis es estimulada y la gluconeogénesis deprimida.

Otro mecanismo que controla el nivel de F-2,6-bisP es dependiente de xilulosa-5-P, intermediario de la vía de pentosa fosfato. La xilulosa-5-P, cuya concentración aumenta cuando más G-6-P entra a las vías de glucólisis y pentosa fosfato, activa la fosfoproteína fosfatasa 2 que desfosforila la enzima bifuncional PFK2/FBPasa2.

En músculos de vuelo de algunos insectos se ha comprobado el funcionamiento de un ciclo aparentemente fútil en esta etapa. Sin embargo, el ciclo de sustrato en este caso cumple una función importante. La hidrólisis de ATP genera calor y asegura la temperatura adecuada para la actividad contráctil.

Etapa fosfoenolpiruvato–piruvato. Sin regulación, las reacciones de esta etapa determinarían un ciclo de sustrato:

$$\text{Fosfoenol piruvato} + \text{ADP} \xrightarrow{\text{Piruvato-quinasa}} \text{Piruvato} + \text{ATP}$$

$$\text{Piruvato} + CO_2 + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Piruvato-carboxilasa}} \text{Oxaloacetato} + \text{ADP} + P_i$$

$$\text{Oxaloacetato} + \text{GTP} \xrightarrow{\text{P-enolpiruvato-carboxiquinasa}} \text{Fosfoenol piruvato} + CO_2 + \text{GDP}$$

El balance total es:

$$\text{GTP} + H_2O \longrightarrow \text{GDP} + P_i$$

Mientras la *piruvato quinasa* es una enzima glucolítica, la *piruvato carboxilasa* y la *fosfoenolpiruvato carboxiquinasa* están involucradas en la gluconeogénesis.

La piruvato carboxilasa está sujeta a control por metabolitos. Especialmente notable es su requerimiento de acetil-CoA como efector alostérico positivo. El acetato activo, producto de la β-oxidación de ácidos grasos, promueve la gluconeogénesis.

El oxaloacetato formado en la reacción catalizada por piruvato carboxilasa es metabolito intermediario del ciclo del ácido cítrico. Su condensación con acetil-CoA inicia la serie de reacciones del ciclo. Cuando la concentración de oxaloacetato disminuye, tiende a acumularse acetil-CoA. Esto estimula la síntesis de oxaloacetato a partir de piruvato y CO_2, lo cual permite al ciclo del ácido cítrico retomar su ritmo de funcionamiento. En este sentido, la acción de acetil-CoA sobre la piruvato carboxilasa no sólo promueve la gluconeogénesis, sino también regula el funcionamiento del ciclo del ácido cítrico.

La piruvato carboxilasa es inhibida por ADP. Probablemente la enzima es regulada *in vivo* por las concentraciones relativas de ATP y ADP. El aumento en el valor de la relación ATP/ADP estimula y la disminución inhibe la enzima (fig. 19-6).

La piruvato quinasa es deprimida por ATP, acetil-CoA y alanina; el efecto del ATP es contrarrestado por ADP. La enzima es sensible a la relación ATP/ADP en sentido inverso al anotado para piruvato carboxilasa. La fructosa-1,6-bisfosfato activa la piruvato quinasa. *In vitro*, la enzima es inhibida por NADH y ácidos grasos libres.

La isozima hepática de piruvato quinasa es regulada además por modificación covalente (fosforilación-desfosforilación) dependiente de AMP cíclico. El aumento en la concentración de AMP-3',5'-cíclico activa la proteína quinasa A, que cataliza la fosforilación de piruvato quinasa y la inactiva.

El oxaloacetato formado por la piruvato carboxilasa es convertido en fosfoenolpiruvato por la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. Esta enzima es regulada primariamente a nivel de su síntesis y degradación. El glucagón aumenta la producción de PEP carboxiquinasa y la insulina la deprime.

La figura 19-6 indica factores reguladores de las etapas que hemos considerado en las vías de glucólisis y gluconeogénesis.

De acuerdo con el papel de la vía glucolítica en cada tejido, hay diferencias en los factores reguladores. En músculo, AMP y ATP son los efectores alostéricos más importantes, porque el principal rol de la glucólisis es proveer energía para la contracción. En cambio, en hígado los mecanismos de control tienden a mantener constante la provisión de glucosa a tejidos extrahepáticos. Cuando la glucemia es elevada se secreta insulina, que activa la vía de Embden-Meyerhof. En estas condiciones, metabolitos como acetil-CoA y fosfodihidroxiacetona son derivados preferentemente a la síntesis de ácidos grasos y triacilgliceroles. Si el nivel de la glucemia es bajo, se

estimula la secreción de glucagón y se activa la gluconeogénesis. Un factor muy importante de coordinación de los procesos de degradación o de producción de glucosa es la fructosa-2,6-bisfosfato, su presencia acelera la glucólisis y deprime la gluconeogénesis.

Los ácidos grasos tienen acción estimulante sobre la gluconeogénesis. En general, los ácidos grasos libres inhiben las quinasas que catalizan las etapas irreversibles de la glucólisis: hexoquinasa, fosfofructoquinasa 1 y piruvatoquinasa. También inhiben las reacciones oxidativas del ciclo de pentosafosfato, esto es, las catalizadas por glucosa-6-fosfato y 6-fosfogluconato deshidrogenasas.

Además de efectos de tipo alostérico, también se ejercen acciones a nivel de la síntesis de enzimas (ver pág. 461).

La regulación de la síntesis de enzimas que catalizan reacciones irreversibles de la glucólisis se efectúa de manera concertada; lo mismo puede decirse de las enzimas responsables de las etapas correspondientes de la gluconeogénesis. Los factores que inducen o reprimen su síntesis actúan simultáneamente y en igual sentido sobre todas las enzimas de cada uno de esos grupos.

Efecto Pasteur

En sus estudios del proceso de fermentación, Pasteur había observado una notable disminución del consumo de glucosa cuando pasaba de un medio anaerobio a otro con abundante provisión de oxígeno. En otros términos, la presencia de oxígeno inhibía la utilización de glucosa.

El fenómeno, llamado *efecto Pasteur*, permaneció sin explicación satisfactoria durante mucho tiempo. Los conocimientos sobre regulación alostérica de enzimas permiten explicar los mecanismos que adecuan la actividad glucolítica a las necesidades energéticas de las células.

La producción de ATP a partir de glucosa es 19 veces mayor cuando se dispone de oxígeno que cuando se carece de él. En anaerobiosis es necesario consumir mayor cantidad de glucosa para obtener un determinado rendimiento de ATP. El efecto Pasteur se explica por las siguientes acciones: a) en aerobiosis aumenta la producción de ATP y citrato, que inhiben la fosfofructoquinasa 1; b) la disminución de actividad fosfofructoquinasa 1 provoca acumulación de metabolitos de etapas anteriores, entre ellos glucosa-6-fosfato. Esta sustancia inhibe la actividad de hexoquinasa. Estos efectos de retroalimentación contribuyen a disminuir la actividad glucolítica en presencia de oxígeno.

La fructosa-2,6-bisfosfato no está involucrada en la producción del efecto Pasteur.

Efecto Warburg. Las células cancerosas presentan una diferencia notable con células normales en cuanto a la utilización de glucosa. Células neoplásicas en aerobiosis consumen menos oxígeno y mayor cantidad de glucosa que las normales. Gran parte de la glucosa en células cancerosas se convierte en lactato, aun cuando se disponga de buena provisión de oxígeno. Esto indica alguna falla en los mecanismos de regulación; no se produce el efecto Pasteur.

Las células normales de los organismos aerobios catabolizan la glucosa hasta su oxidación final en CO_2 y H_2O, lo que reditúa un excelente rendimiento en términos de ATP por fosforilación oxidativa. En las células neoplásicas, en cambio, la producción de ATP a partir de glucosa se limita a la que aporta la glucólisis. Esto no se debe a la falta de los factores necesarios para su metabolización completa, ya que tanto las enzimas glucolíticas, así como la piruvato deshidrogenasa y las del ciclo de Krebs están presentes. Este fenómeno, llamado *glucólisis aeróbica*, o también *efecto Warburg*, nombre del bioquímico alemán que lo describió por primera vez, no ha sido claramente explicado hasta el presente.

Se ha propuesto, como hipótesis, que en tejidos con gran actividad mitótica o proliferativa, el metabolismo se adapta para promover la captación de nutrientes y la síntesis de componentes para las células neoformadas (nucleótidos, aminoácidos, lípidos), antes que la acumulación de ATP.

Descarboxilación oxidativa de piruvato

Esta etapa es muy importante; se trata de una reacción sin retorno. Una vez que el piruvato se transforma en acetil-CoA se pierde toda posibilidad de volver a formar glucosa.

La *piruvato deshidrogenasa* (PDH) es un complejo multienzimático regulado alostéricamente y también por modificación covalente. Es inhibido directamente por sus productos, acetil-CoA y NADH y por ATP, en acciones de control rápido. También es inactivado por fosforilación catalizada por *piruvato deshidrogenasa quinasa*. El complejo es estimulado por acción de la *piruvato deshidrogenasa fosfatasa*. Ambas enzimas, quinasa y fosfatasa, forman parte del complejo PDH.

La PDH quinasa, a su vez, es activada por acetil-CoA, NADH y ATP e inhibida por piruvato, CoA-SH, NAD^+ y ADP. De este modo, el aumento de acetil-CoA y NADH, deprime la actividad del complejo PDH, al tiempo que una amplia provisión de sustratos la estimula (fig. 19-7).

El mecanismo de fosforilación-desfosforilación de piruvato deshidrogenasa no es dependiente de los niveles de AMP cíclico. La insulina promueve la activación de PDH fosfatasa. La enzima es estimulada por aumento de los niveles de Ca^{2+} intramitocondrial e inhibida por NADH.

La actividad de PDH aumenta en músculo durante el ejercicio intenso; este efecto es causado principalmente por la elevación de las concentraciones de ADP y piruvato, que inhiben la PDH quinasa y por el incremento de Ca^{2+}, que estimula la PDH fosfatasa. Estos factores contribuyen a mantener el complejo PDH en estado desfosforilado, es decir, activo.

La piruvato deshidrogenasa responde al estado de energía de la célula. Cuando el nivel de ATP es elevado, la glucólisis disminuye y la actividad de PDH se inhibe. También es sensible al estado redox, indicado por el valor de la relación $NADH/NAD^+$.

La reacción catalizada por PDH controla la velocidad con la cual el piruvato procedente de carbohidratos y de esqueletos carbonados de algunos aminoácidos es convertido en acetil-CoA. Los productos de oxidación de ácidos grasos (acetil-CoA, NADH y ATP) inhiben a la PDH y contribuyen a ahorrar glucosa y aminoácidos. En los tejidos que utilizan indistintamente ácidos grasos o glucosa como fuentes de energía es importante este efecto, que permite economizar glucosa y reservarla para tejidos como el nervioso, que dependen de la glucosa como combustible casi exclusivo. En cuanto a los aminoácidos, de los cuales no existen depósitos a utilizar como reserva energética, su catabolismo es limitado cuando se dispone de otros sustratos oxidables.

Regulación del ciclo del ácido cítrico

La oxidación de acetil-CoA y la simultánea reducción de NAD^+ y FAD en el ciclo del ácido cítrico proveen energía para la síntesis de ATP en mitocondrias. La intensidad de utilización de ese ATP es el principal factor regulador del ciclo. El estado de energía de la célula se refleja en la relación entre los adenilatos, así como el estado redox es indicado por la relación $NADH/NAD^+$. Estas relaciones tienen un papel esencial en el control de la actividad del ciclo.

Tres son las etapas en las cuales se ejercen las más notables acciones regulatorias. La más importante es la catalizada por *isocitrato deshidrogenasa*, enzima alostérica. Otras dos reacciones consideradas sitios de control son las catalizadas por *α-ceto-glutarato deshidrogenasa* y *citrato sintasa*, que no son alostéricas.

La *isocitrato deshidrogenasa* dependiente de NAD es activada por ADP e inhibida por NADH. La unión de ADP a la enzima produce un cambio conformacional que disminuye la K_m para sustrato. El ATP actúa como efector negativo. El aumento del valor de la relación $NADH/NAD^+$ reduce la actividad de la enzima. La isocitrato deshidrogenasa ligada a NADP no posee las propiedades regulatorias de la dependiente de NAD; no es estimulada por ADP ni inhibida por ATP y NADH.

El complejo *α-cetoglutarato deshidrogenasa*, si bien no es alostérico, responde igual que la isocitrato deshidrogenasa a los cambios de ADP, ATP y NADH. Es inhibido por el producto, succinil-CoA. El complejo α-cetoglutarato deshidrogenasa de miocardio y músculo esquelético es activado por el aumento de los niveles de Ca^{2+}.

La *citrato sintasa* no es alostérica. Su actividad es modulada por las concentraciones de sustrato y producto; el citrato actúa como inhibidor. Cuando se activa la isocitrato deshidrogenasa se consume citrato y se reduce la inhibición por producto de la citrato sintasa.

El sustrato, oxaloacetato, se produce en la última reacción del ciclo (malato a oxaloacetato). El equilibrio es ampliamente favorable a malato, de modo que la concentración de oxaloacetato en mitocondrias es muy baja. Cuando la relación $NADH/NAD^+$ disminuye, también se reduce la relación malato/oxaloacetato, aumenta la concentración de oxaloacetato y la actividad de citrato sintasa. Especialmente en hígado, la relación $NADH/NAD^+$ indica el camino a seguir por el acetil-CoA; si el valor de la relación aumenta, se deprime la citrato sintasa; en estas condiciones, el acetil-CoA sigue preferentemente la vía de síntesis de cuerpos cetónicos.

En esta sección se citarán también acciones modulatorias de una reacción no perteneciente al ciclo de ácidos tricarboxílicos, pero que lo alimenta, es decir, lo provee de uno de sus intermediarios.

La *glutamato deshidrogenasa*, enzima que cataliza la desaminación oxidativa del ácido glutámico, conecta el metabolismo de aminoácidos con el ciclo del ácido cítrico. Esta enzima utiliza indistintamente NAD o NADP como coenzima. La reacción con NAD aporta electrones a la cadena respiratoria, mientras los hidrógenos transferidos a NADP son preferentemente derivados hacia procesos de síntesis (ácidos grasos, esteroides). El ATP actúa como efector negativo; inhibe la reacción de oxidación cuando participa NAD, pero carece de acción regulatoria sobre la reacción con NADP. El efecto es similar al descripto para isocitrato deshidrogenasa.

La figura 19-7 resume las acciones descriptas.

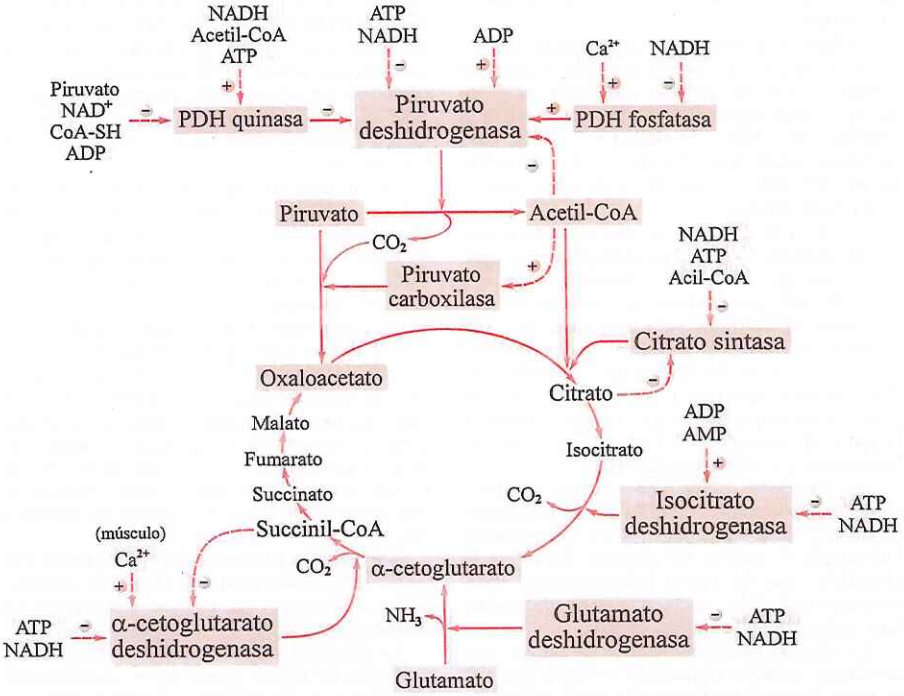


Fig. 19-7. Acciones regulatorias de piruvato deshidrogenasa y ciclo del ácido cítrico.

Regulación del metabolismo de ácidos grasos

Lipólisis. El tejido adiposo constituye la mayor reserva de grasas del organismo. Esta reserva es movilizada para suministrar combustible a órganos como hígado, riñón, corazón, músculo esquelético y otros con capacidad para oxidar ácidos grasos.

Los ácidos grasos de triacilgliceroles (TAG) de depósito son liberados por acción de la *lipasa* específica de tejido adiposo, enzima sensible a hormonas. En los adipocitos se encuentra en dos formas, inactiva o desfosforilada y activa o fosforilada. Su activación se alcanza por un proceso en cascada, similar al descripto para la glucógeno fosforilasa.

Debido a la intensa actividad de esta enzima, las grasas del tejido adiposo están en permanente remoción. Los TAG se renuevan totalmente cada dos o tres semanas.

Si no hay demanda desde los tejidos que utilizan ácidos grasos, la lipasa está inactiva y las *perilipinas*, proteínas que rodean la gotita de grasa en cada adipocito, están desfosforiladas. En este estado, las perilipinas no permiten a la lipasa entrar en contacto con los triacilgliceroles. La activación de la proteína quinasa A estimula la adición de fosfato a la lipasa y a las perilipinas y desencadena la lipólisis.

Catecolaminas (adrenalina y noradrenalina), glucagón y adrenocorticotrofina (ACTH) se unen a receptores en la membrana plasmática de adipocitos y activan la *adenilato ciclasa*. Aumenta el nivel de AMP cíclico en el citosol y se estimula la *proteína quinasa A*, enzima que cataliza la fosforilación de la lipasa y de las perilipinas.

Las hormonas tiroestimulante, triyodotironina (T_3) y prolactina también aumentan la actividad lipolítica en adipocitos. La hormona de crecimiento y glucocorticoides estimulan la síntesis de lipasa.

La insulina, algunas prostaglandinas y el ácido nicotínico (vitamina del complejo B) actúan como factores antilipolíticos, pues disminuyen la concentración intracelular de AMP cíclico. La insulina, además, estimula la *proteína fosfatasa*,

que desfosforila a la lipasa y a las perilipinas y las inactiva.

Si bien no pertenecen a mecanismos fisiológicos de regulación, anotaremos aquí el efecto de cafeína y teofilina, purinas metiladas inhibidoras de la *fosfodiesterasa*, enzima que cataliza la hidrólisis de AMP-3',5'-cíclico a 5'-AMP. Esas sustancias mantienen elevado el nivel intracelular de AMP cíclico y con ello la actividad lipolítica en tejido adiposo.

La figura 19-8 resume las acciones descriptas.

Simultáneamente con la inhibición de la lipólisis, la insulina promueve el depósito de grasas a través de múltiples acciones que determinan mayor oferta de sustratos para la síntesis de TAG. Estimula la síntesis y secreción de *lipoproteína lipasa* (LpL) de endotelio capilar; la hidrólisis de TAG de quilomicrones y VLDL provee ácidos grasos a los adipocitos (a esta acción contribuye la apo C-II, activadora de LpL, cedida a los quilomicrones y a VLDL por las HDL).

Por otra parte, la insulina aumenta el número de transportadores GLUT4 en la membrana plasmática de los adipocitos y en consecuencia incrementa el ingreso de glucosa. Se activa la glucólisis, uno de cuyos intermediarios, dihidroxiacetonafosfato, es convertido en glicerofosfato, precursor en la síntesis de TAG.

La relación glucagón/insulina en sangre, que disminuye cuando la glucemia es alta y viceversa, es un factor importante en la regulación de la lipólisis.

En condiciones de ayuno prolongado se estimula la secreción de glucagón y se deprime la de

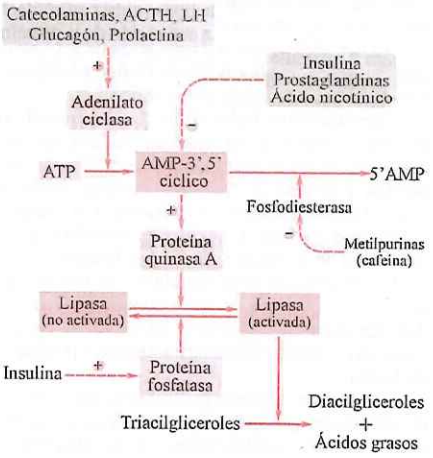


Fig. 19-8. Regulación de la lipólisis.

insulina. En el hígado, los ácidos grasos son oxidados a acetil-CoA, pero éste no ingresa al ciclo del ácido cítrico en esas condiciones; es preferentemente convertido en cuerpos cetónicos, que se ofrecen a los tejidos como fuente de energía. El ATP generado en el hígado por la oxidación de ácidos grasos es utilizado para impulsar la gluconeogénesis.

Los niveles en sangre de adrenalina, noradrenalina y ACTH, hormonas que activan la lipólisis, aumentan durante el ejercicio físico intenso y en situaciones de estrés. La rápida liberación de ácidos grasos asegura provisión de combustible a músculo, corazón, hígado y riñones.

En condiciones de buen aporte alimentario, los tejidos reciben ácidos grasos liberados de los TAG de quilomicrones y VLDL por la lipoproteína lipasa de endotelio capilar. La enzima de músculo, particularmente el cardíaco, tiene gran afinidad (baja K_m) para ambas lipoproteínas y actúa aun a bajas concentraciones de quilomicrones y VLDL. La LpL de capilares de tejido adiposo tiene una K_m más elevada y es más activa cuando los niveles de esas lipoproteínas en sangre son altos.

β-oxidación y síntesis de ácidos grasos. Para evitar el funcionamiento de ciclos de sustrato o fútiles, los factores que promueven la síntesis de ácidos grasos inhiben la oxidación y viceversa.

La principal enzima regulatoria en la vía de oxidación de ácidos grasos es la *carnitina-aciltransferasa I*. Es inhibida alostéricamente por *malonil-CoA*, intermediario de la síntesis de ácidos grasos. De este modo, el aumento en la concentración de malonil-CoA bloquea el ingreso de ácidos grasos en mitocondrias, donde tiene lugar la β-oxidación.

Después de una comida rica en carbohidratos, en el hígado se activa la síntesis de ácidos grasos y se deprime la oxidación.

La *acetil-CoA carboxilasa* que cataliza la conversión de acetil-CoA en malonil-CoA es el sitio de regulación más importante de la vía de síntesis. Su actividad es modulada por fosforilación-desfosforilación. La adición de fosfato, catalizada por la proteína quinasa A dependiente de AMP cíclico o por la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), reduce su actividad. La activación es catalizada por proteína fosfatasa, estimulada por insulina que por otro lado induce la síntesis de acetil-CoA carboxilasa. Esta enzima es también activada alostéricamente por citrato, efecto que es revertido por la presencia de acil-CoA de cadena larga (palmitoil-CoA).

El músculo en reposo usa ácidos grasos como combustible. Cuando la provisión de sustrato es abundante, se inhibe la oxidación de glucosa. La

β-oxidación produce acetil-CoA y NADH, inhibidores de la piruvato deshidrogenasa. Cuando la producción de ATP por oxidación de ácidos grasos es suficiente para atender las necesidades del músculo, se inhibe la vía glucolítica.

Cuando el músculo realiza un trabajo intenso, hay disminución de ATP y aumento de AMP. Esto inhibe a la acetil-CoA carboxilasa fosforilada por la AMPK. La subsiguiente reducción de malonil-CoA tiende a estimular el transporte de acilcarnitina a la mitocondria y promueve la β-oxidación, con la consiguiente producción de ATP.

En individuos bien alimentados (relación glucagón/insulina baja), la acetil-CoA carboxilasa en hígado es activa y los niveles de malonil-CoA son elevados. En estas condiciones, los ácidos grasos sintetizados son preferentemente incorporados en TAG en vez de oxidarlos en mitocondrias o convertirlos en cuerpos cetónicos.

Otras acciones de la insulina incluyen la inducción de la síntesis de ácido graso sintasa, y también de enzimas que generan NADPH: málica, glucosa-6-fosfato y 6-fosfogluconato deshidrogenasas.

Regulación de la biosíntesis de colesterol

Algunas acciones regulatorias han sido mencionadas (pág. 322).

El nivel de colesterol en las células y varias hormonas, entre ellas insulina, glucagón, triyodotironina (T_3) y cortisol, influyen sobre la síntesis de colesterol. Los principales mecanismos en juego son la modificación covalente y el control de la transcripción génica.

La etapa más importante en la regulación de la síntesis de colesterol es la conversión de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA en mevalonato, catalizada por la *3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa* (HMG-CoA reductasa). La actividad de esta enzima es modulada por modificación covalente (fosforilación-desfosforilación); la fosforilación la deprime. El glucagón promueve la inactivación de la reductasa por acción de una quinasa. En cambio la desfosforilación, catalizada por una fosfatasa, es favorecida por acción de la insulina. Como esta hormona estimula la glucólisis, la piruvato deshidrogenasa y las reacciones de la vía de pentosa fosfato aumenta la provisión de acetil-CoA y NADPH y con ello la síntesis de colesterol.

Además, la reductasa es regulada por el contenido de colesterol en la célula. El aumento de la concentración de colesterol deprime la actividad de la enzima y también su transcripción a nivel genético. El gen que codifica para esta enzima es controlado por una familia de proteínas llamadas *proteínas de unión al elemento regulatorio* (SREBP). Cuando los niveles de colesterol intracelular son elevados, la SREBP es inactiva; si el colesterol disminuye, se produce una hidrólisis que separa el dominio N-terminal de la SREBP, el cual induce la producción de HMG-CoA reductasa.

La acción de hormonas se ejerce también sobre la síntesis de la enzima. La T_3 la induce y el cortisol la reprime. La HMG-CoA reductasa tiene corta vida media (2 horas), de modo que las acciones represoras de la síntesis se manifiestan ya a las tres horas.

El nivel de colesterol en la célula controla la síntesis de receptores LDL. Cuando el colesterol intracelular aumenta, disminuye el número de receptores y la captación de LDL del plasma, que es la principal fuente de colesterol en la mayoría de tejidos.

Muchas acciones regulatorias se ejercen postraducción (ver pág. 470), entre ellas, la ubicuitinación, que marca proteínas para su degradación. Observaciones recientes han demostrado que proteínas clave en el metabolismo de colesterol, comprometidas en la síntesis [3-hidroxi-3-metil-glutaril reductasa (HMGR) y escualeno monooxigenasa (EM)], en la captación por parte de las células [receptores LDL (LDLR)] y en el flujo celular (transportadores ABCA 1 y ABCG 1) de colesterol, son pasibles de regulación mediante este mecanismo, que determina su hidrólisis en proteasomas (pág. 470) o, en caso de desubicuitinación, se asegura su estabilización.

Cuando el colesterol está en niveles bajos, HMGR, EM y LDLR son estabilizados para aumentar la síntesis y captación de colesterol, y ABCA 1 y ABCG 1 son degradados. En cambio, cuando el colesterol es elevado, ABCA 1 y ABCG 1 son estabilizados para activar el eflujo, mientras LDLR, HMGCR y EM son degradados.

Regulación del metabolismo de compuestos nitrogenados

La actividad del ciclo de la urea está estrechamente relacionada con la dieta. Si ésta es exageradamente rica en proteínas, los esqueletos carbonados de los aminoácidos constituyen la mayor fuente de energía. Del mismo modo, en estados de inanición se recurre a la degradación de las propias proteínas, principalmente musculares. En ambos casos se estimula la síntesis de todas las enzimas involucradas en la formación de urea, que se genera en gran cantidad. La actividad de esas enzimas es más elevada en perso-

nas en inanición o con dietas hiperproteicas que en individuos con una alimentación equilibrada, en la que hidratos de carbono y grasas son los principales proveedores de energía.

El ajuste rápido del funcionamiento del ciclo se produce por regulación de una enzima clave, la carbamilfosfato sintetasa I, activada alostéricamente por N-acetilglutamato, a su vez sintetizado por la N-acetilglutamato sintasa.

Con respecto al metabolismo de aminoácidos, generalmente en las vías de síntesis, son frecuentes los ejemplos de inhibición de enzimas por producto final. Esto ha sido estudiado preferentemente en sistemas bacterianos, aunque también se ha demostrado este tipo de control en enzimas de tejidos de mamíferos.

Según se ha expuesto en los capítulos respectivos, la biosíntesis de hemo, purinas y pirimidinas presenta ejemplos de regulación por retroalimentación. Estudios *in vitro* indican que el producto final inhibe la enzima que cataliza la primera etapa de la vía. En el organismo las interacciones son mucho más complejas y probablemente existan otros mecanismos de control aún no conocidos.

Interacciones metabólicas

Como ejemplos de relaciones entre diferentes vías citaremos los llamados "ciclos" glucosa-ácidos grasos y glucosa-alanina.

Ciclo glucosa-ácidos grasos. Se lo designa también con el nombre de *ciclo de Randle*, aunque en realidad no se trata estrictamente de un ciclo. Fue descripto a partir de la observación de la notable reducción en la captación y utilización de glucosa que se produce en músculo cuando en este tejido la actividad de oxidación de ácidos grasos es intensa.

Este fenómeno es explicado del siguiente modo: la oxidación de ácidos grasos produce acetil-CoA, a partir del cual, por acción de la citrato sintasa, se genera citrato. Valores elevados de las relaciones acetil-CoA/CoA y NADH/NAD^+ estimulan la piruvato deshidrogenasa quinasa, que fosforila la piruvato deshidrogenasa y la inactiva. Paralelamente hay depresión de la glucólisis, ya que el citrato y el ATP inhiben la fosfofructoquinasa. Se acumulan sustratos de etapas anteriores, entre ellos glucosa-6-fosfato, que tiene efecto inhibidor sobre la hexoquinasa.

En tejido adiposo también se observan interacciones glucosa-ácidos grasos. Cuando la cantidad de glucosa en sangre es alta, el páncreas secreta insulina. Esta hormona deprime la lipólisis y estimula la lipogénesis; en consecuencia, disminuye la concentración de ácidos grasos libres en plasma.

Fig. 19-9. Ciclo glucosa-alanina.

Después de una comida, cuando glucemia e insulinemia son elevadas, el músculo tiende a utilizar predominantemente glucosa antes que ácidos grasos. En cambio, en períodos alejados de las comidas la glucemia desciende a sus valores basales, la secreción de insulina disminuye y la concentración de ácidos grasos libres en plasma aumenta. En estas condiciones se tiende a preservar glucosa para los tejidos que no pueden utilizar ácidos grasos y dependen exclusivamente de glucosa como fuente de energía. El efecto de la oxidación de ácidos grasos en músculo sobre la utilización de glucosa ayuda a lograr este objetivo.

Ciclo glucosa-alanina. Funciona entre músculo e hígado y contribuye a mantener la glucemia durante los períodos que median entre comidas. En el músculo la glucosa recorre la vía glucolítica para dar piruvato. Este compuesto puede recibir un grupo amina por transaminación con glutamato y formar alanina, que pasa a la sangre, desde donde es captada por el hígado. En este órgano la alanina transamina con α-cetoglutarato y es convertida en piruvato, a partir del cual se genera glucosa por la vía de gluconeogénesis. La alanina representa una forma de transporte de NH_3 y piruvato desde el músculo al hígado. La glucosa formada en el hígado vuelve a la circulación, desde donde es tomada por los tejidos, entre ellos el músculo, para cerrar el ciclo (fig. 19-9).

Regulación de las oxidaciones celulares

Los electrones cedidos por los sustratos que se oxidan son canalizados al sistema de transporte de la cadena respiratoria, constituida por una

serie de aceptores ordenados en la membrana interna de las mitocondrias (pág. 171). La transferencia de electrones en esta cadena se acompaña del bombeo de protones fuera de la matriz. El retorno de los protones a través de los complejos F_0F_1 motoriza el proceso de formación de ATP a partir de ADP.

En mitocondrias, oxidación y fosforilación están acopladas de tal modo que el transporte de electrones no puede realizarse sin la concomitante fosforilación de ADP. La presencia de ADP es requisito indispensable para las oxidaciones celulares; la actividad de éstas es altamente dependiente de la concentración relativa de adenilatos.

Dentro de cada célula, el total de adenilatos (AMP + ADP + ATP) se mantiene prácticamente constante. La proporción de cada uno de ellos varía de un momento a otro.

Los procesos endergónicos generalmente se realizan a expensas de la hidrólisis de ATP y dan como productos ADP, AMP y P_i. ADP y AMP deben ser refosforilados para restaurar la reserva energética de la célula.

En algunos tejidos existe una *adenilato quinasa* que cataliza, en ambos sentidos, la siguiente reacción:

$$AMP + ATP \underset{}{\overset{\text{Adenilato quinasa}}{\rightleftharpoons}} 2\ ADP$$

Esta reacción permite transferir una unión fosfato de alta energía al AMP para formar ADP o, en sentido inverso, obtener una molécula de ATP a partir de dos de ADP.

Durante la fosforilación acoplada a la oxidación en la cadena respiratoria, el ADP es convertido en ATP. Si la totalidad de los adenilatos en la célula estuviese al estado de ATP, el funcionamiento del sistema de transporte de electrones se detendría. Al realizarse algún trabajo se hidroliza ATP a ADP. Este ADP estimula la respiración, la cual, a su vez, contribuye a regenerar ATP.

Papel regulador de los adenilatos

La cantidad de energía almacenada en la célula puede considerarse directamente relacionada con el número de enlaces fosfato de alta energía en los adenilatos.

Parangonando la célula con un acumulador, el número total de uniones fosfato de alta energía corresponde a la carga en un momento dado; es máxima cuando todos los adenilatos se encuentran al estado de ATP y mínima o nula si todos se convierten en AMP.

La *carga de energía* se expresa por el valor de la siguiente relación entre concentraciones de adenilatos:

$$\text{Carga energética} = \frac{[ATP] + \frac{1}{2}[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

La carga de energía alcanza un valor de 1 cuando todos los adenilatos están fosforilados al máximo (como ATP) y es 0 si sólo existen al estado de AMP. En condiciones normales, el valor de la carga energética oscila alrededor de 0,9, lo cual indica que la gran mayoría de los nucleótidos de adenina están al estado de ATP.

Además de influir sobre la respiración celular, los nucleótidos de adenina actúan como moduladores de importantes enzimas regulatorias en diversas vías, según ya se ha mencionado.

Los sistemas metabólicos generadores de ATP, y también los que lo consumen, son sensibles a la carga de energía de la célula, es decir, al balance total de adenilatos contenidos en ella.

Para un sistema productor de energía, la actividad aumenta cuando la carga disminuye y se deprime cuando la carga es elevada. Las vías metabólicas que utilizan energía, en cambio, son activadas cuando la carga es alta y se inhiben cuando ésta se reduce.

De este modo, la carga energética regula prácticamente todo el metabolismo celular. El aumento relativo de ATP tiene efecto negativo sobre procesos generadores de energía (glucólisis, ciclo del ácido cítrico) y modula positivamente las vías que consumen energía (síntesis de aminoácidos, gluconeogénesis). La figura 19-10 resume estas acciones.

Un efector importante en el mantenimiento del balance energético es una enzima llamada *AMP quinasa* (AMPK). Es activada por la reduc-

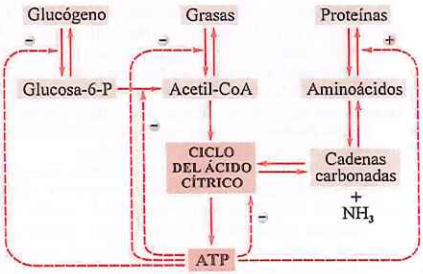


Fig. 19-10. Papel regulador del ATP.

ción de la concentración de ATP en la célula o, más precisamente, por el aumento de la relación [AMP]/[ATP]. En su estado activo, la AMPK inicia cascadas de fosforilación que pueden desencadenar la expresión de una variedad de genes. Como resultado se produce inhibición de vías metabólicas que consumen ATP y estimulación de vías que generan ATP.

En el capítulo 25, al considerar mecanismos de acción hormonal, tendremos oportunidad de referir otros ejemplos de acciones regulatorias sobre el metabolismo. Lo expuesto permite inferir cómo la acción concertada de múltiples factores asegura el funcionamiento de la "maquinaria metabólica" en armonía con los requerimientos del organismo.

RESUMEN

Integración metabólica. La interrelación de las vías metabólicas asegura el comportamiento funcional unitario del organismo. Compuestos de muy diverso origen y naturaleza pueden llegar a formar los mismos metabolitos y productos. Hexosas, glicerol, ácidos grasos y algunos aminoácidos generan acetil-CoA, uno de cuyos destinos es la oxidación en el ciclo de Krebs. Otros aminoácidos dan productos intermedios del ciclo del ácido cítrico. En última instancia, todos los compuestos que convergen al ciclo de Krebs son oxidados a CO_2 y H_2O. La cadena respiratoria es una vía final común hacia la cual se canalizan electrones cedidos por muy diversos sustratos. Los glúcidos generan triacilgliceroles, pues la glucosa da acetil-CoA con la cual se sintetizan ácidos grasos y la dihidroxiacetonafosfato, intermediario de la glucólisis, puede convertirse en glicerol. La glucosa también origina α-cetoácidos que generan aminoácidos por transaminación. Después de desaminación, los aminoácidos pueden formar glúcidos o cuerpos cetónicos. Según esto se dividen en glucogénicos o cetogénicos. El glicerol es el único componente de lípidos potencialmente glucogénico; los ácidos grasos no lo son. Algunos metabolitos son verdaderas "encrucijadas"; a ellos convergen y de ellos parten numerosas vías (ej.: glucosa-6-P, piruvato, acetil-CoA).

Regulación metabólica. Dos mecanismos principales: *1) Modificación de la actividad de enzimas preexistentes.* a) Concentración de sustrato: a concentraciones menores a la K_m, la actividad enzimática es directamente proporcional a [S]. b) Metabolitos regulatorios: efectores alostéricos. c) Modificación covalente. *2) Aumento o disminución del número de moléculas de enzima.* a) Síntesis: regulada principalmente a nivel de la transcripción. b) Degradación.

Glucogenólisis. La principal enzima regulatoria es la glucógeno fosforilasa. La forma inactiva (*b*) es convertida en activa (*a*) por fosforilación catalizada por fosforilasa *b* quinasa. La reacción inversa o inactivación es catalizada por proteína fosfatasa 1. La activación es producida por reacciones en cascada, iniciadas por adrenalina en músculo y glucagón en hígado. Cuando la hormona se fija a su receptor en la membrana, activa a la adenilato ciclasa, que cataliza la formación de AMP-3',5'-cíclico (AMPc). El aumento de AMPc activa la proteína quinasa A, que convierte fosforilasa *b* quinasa *b* (inactiva) en *a* (activa). Esta última es la responsable final de la activación de la glucógeno fosforilasa. Las reacciones en cascada producen una notable amplificación de la respuesta. El AMPc es hidrolizado a AMP por la fosfodiesterasa. En el músculo, la fosforilasa puede ser activada por otro mecanismo no dependiente de AMPc, sino de Ca^{2+}. La fosforilasa *b* es activada por AMP, que actúa como efector alostérico (sin fosforilación). El ATP y la glucosa-6-P actúan como modificadores negativos. La fosforilasa *a* es activa cualesquiera sean las concentraciones de ATP, AMP o G-6-P.

Glucogenogénesis. La principal enzima regulatoria es la glucógeno sintasa (GS). La forma inactiva (*b*) es fosforilada; la activa (*a*) es desfosforilada. La estimulación es catalizada por proteína fosfatasa 1, la misma que inactiva fosforilasa y fosforilasa quinasa. La inactivación de la GS se produce por reacciones en cascada como las que activan a la fosforilasa. En el hígado, la estimulación de GS es promovida por altos niveles de glucosa y de insulina. G-6-P y Ca^{2+} actúan como efectores positivos y negativos, respectivamente, de GS.

Glucólisis. Hexoquinasa: inhibida por G-6-P. Fosfofructo quinasa 1: principal enzima regulatoria de la vía. Inhibida por ATP y citrato; estimulada por AMP, P_i y F-2,6-bisP. Piruvatoquinasa: Inactivada por fosforilación dependiente de AMPc. Inhibida por ATP y estimulada por F-1,6-bisP.

Gluconeogénesis. Glucosa-6-P fosfatasa: inhibida por glucosa y P_i. Fructosa-1,6-bisP fosfatasa: inhibida por AMP, ADP y F-2,6-bisP. Piruvato carboxilasa: activada por acetil-CoA. En cuanto a la síntesis de estas enzimas, los factores que inducen las enzimas glucolíticas reprimen las gluconeogénicas y viceversa.

Efecto Pasteur. El consumo de glucosa disminuye en presencia de oxígeno. Acciones alostéricas sobre la fosfofructoquinasa son responsables del fenómeno.

Descarboxilación oxidativa de piruvato. Piruvato deshidrogenasa (PDH): es un complejo multienzimático inactivado por fosforilación no dependiente de AMPc. PDH es estimulada por una fosfatasa activada por Ca^{2+}. La quinasa que fosforila PDH se activa por acetil-CoA, NADH y ATP.

Ciclo del ácido cítrico. Citrato sintasa: inhibida por ATP. Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD: estimulada por ADP e inhibida por ATP y NADH. α-cetoglutarato deshidrogenasa: inhibida por succinil-CoA, NADH y ATP. Glutamato deshidrogenasa: el ATP actúa como efector negativo. El aumento de la relación $NADH/NAD^+$ en la matriz mitocondrial deprime la actividad de las deshidrogenasas dependientes de NAD.

Metabolismo de ácidos grasos. La liberación de ácidos grasos de los depósitos es catalizada por lipasa, que se activa por un proceso en cascada iniciado por hormonas (catecolaminas, ACTH, glucagón) que activan la adenilato ciclasa y producen aumento de AMPc, el cual estimula la proteína quinasa A. *β-oxidación*. Malonil-CoA inhibe el transporte de acilos a mitocondrias actuando sobre carnitina-aciltransferasa 1. 3-OH-acil-CoA deshidrogenasa: inhibida por NADH. Tiolasa: inhibida por acetil-CoA. *Biosíntesis de ácidos grasos*. Acetil-CoA carboxilasa es la principal enzima regulatoria. Inactivada por fosforilación dependiente de AMPc y estimulada por acción de una fosfatasa. El citrato es efector alostérico positivo; los acil-CoA de cadena larga la inhiben.

Biosíntesis de colesterol. 3-OH-3-metilglutaril-CoA reductasa es enzima regulatoria. Se inactiva por fosforilación resultante de reacciones en cascada. Activada por una fosfatasa. El aumento de la concentración de colesterol la deprime.

Metabolismo de compuestos nitrogenados. En vías de biosíntesis de aminoácidos, purinas y pirimidinas es frecuente la regulación por producto final. Este inhibe la enzima que cataliza la primera etapa de la vía.

Oxidaciones celulares. La presencia de ADP es requisito indispensble para que se cumplan las oxidaciones. La carga de energía se expresa por la relación:

$$\frac{[ATP] + \frac{1}{2}[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

Cuando su valor es elevado se estimulan vías metabólicas que consumen energía; en cambio se inhiben aquellas productoras de ATP. La AMP quinasa es un efector importante en esta regulación. Es activada cuando el valor de la relación de adenilatos disminuye.

BIBLIOGRAFÍA

Agius L. (2008). Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochemical Journal*, 414: 1-18.

Fell D. (1997). *Understanding the Control of Metabolism*, Portland Press, Londres.

Jensen T.E., Richter E.A. (2012). Regulation of glucose and glycogen metabolism pathways during and after exercise. *Journal of Physiology*, 590: 1069-1076.

Morris S.M. (2002). Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 22: 97-105.

Pilkis S.J., Granner D. (1992). Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annual Review of Physiology*, 54: 885-909.

Salter M., Knowles R.G., Pogson C.I. (1994). Metabolic control. *Essays in Biochemistry*, 28: 1-12.

Semenkovich C.F. (1997). Regulation of fatty acid synthase (FAS). *Progress in Lipid Research*, 36: 43-53.

Sharpe L.J., Cook E.C.L., Zelcer N., Brown A.J. (2014). The UPS and downs of cholesterol homeostasis. *Trends in Biochemical Sciences*, 39: 527-536.

Van der Heiden M.G., Cantley L.C., Thompson C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324: 895-899.

CAPÍTULO 20

Metabolismo en algunos tejidos

Si bien las vías metabólicas principales se cumplen en la casi totalidad de las células de un individuo, cada órgano o tejido presenta características peculiares, de acuerdo con su especialización funcional.

En este capítulo se considerará el "perfil metabólico" de los tejidos cuya actividad influye en mayor medida en la utilización de nutrientes.

HÍGADO

La mayoría de los productos de la digestión absorbidos en intestino son vehiculizados por la vena porta y ofrecidos en primera instancia al hígado, el cual está sometido a un aporte discontinuo de nutrientes, muy variado en cantidad y calidad, que exige de este órgano una gran ductilidad metabólica.

El hígado es el principal encargado del procesamiento inicial de esos nutrientes y de su distribución al resto del organismo; la regulación de estas funciones contribuye decisivamente a mantener constantes los niveles sanguíneos de diversos metabolitos.

Los hepatocitos experimentan importantes cambios en su contenido de glucógeno y proteínas según el aporte de nutrientes; además muestra gran adaptabilidad funcional, la cual se expresa principalmente por la inducción de enzimas específicas, en relación con la disponibilidad de sustratos.

A continuación se resumen las principales transformaciones metabólicas de nutrientes y otras sustancias en el hígado.

Metabolismo de carbohidratos

Del total de monosacáridos absorbidos en intestino después de cada comida, aproximadamente dos terceras partes son captadas por el hígado; el resto pasa a la circulación general. La glucosa que llega por la vena porta penetra en los hepatocitos por un proceso de difusión facilitada. La mayoría de los transportadores en hígado son del tipo GLUT2, de baja afinidad, que permiten el flujo a favor del gradiente cuando el nivel de glucosa en uno de los lados de la membrana es elevado; no son influidos por insulina. En el interior de la célula, la glucosa es convertida en glucosa-6-fosfato mediante reacción catalizada por *glucoquinasa*. Esta enzima, específica para glucosa, posee alto valor de K_m; su actividad es realmente significativa cuando los niveles de glucosa se elevan por encima de los valores basales, como sucede inmediatamente después de una comida rica en hidratos de carbono.

La formación de glucosa-6-P "atrapa" la glucosa dentro de la célula, pues la membrana es impermeable a dicho metabolito; como la reacción consume glucosa, ayuda a mantener el gradiente descendente y permite que continúe el ingreso a la célula.

La fructosa y la galactosa absorbidas en intestino son metabolizadas en hígado y pueden generar productos intermedios iguales a los que se forman en vías de utilización de glucosa (ej.: la fructosa forma fructosa-6-P, convertible en glucosa-6-P por la fosfoglucomutasa, o fructosa-l-P, que se desdobla en dihidroxiacetonafosfato y gliceraldehído, compuestos que ingresan en la vía glucolítica o sirven para la síntesis de glucosa por

el camino de la gluconeogénesis). La galactosa es transformada en UDP-glucosa, compuesto que se utiliza en la síntesis de glucógeno.

La glucosa-6-P es una encrucijada metabólica de la cual parten varias vías:

Glucogenogénesis. La glucosa-6-P, previa conversión en glucosa-1-P y UDP-glucosa, es almacenada como glucógeno en el hígado. La reserva de glucógeno en sujetos bien alimentados representa de 5 a 10% (75 a 150 g) del peso total del órgano.

Degradación. La glucosa-6-P se convierte en piruvato por la vía glucolítica. El piruvato es descarboxilado a acetil-CoA, el cual se oxida a CO_2 y H_2O en el ciclo del ácido cítrico. Esta vía oxidativa genera ATP; sin embargo, la glucosa no es la más importante fuente de energía en el hígado. En este órgano los ácidos grasos son el combustible principal.

Vía de pentosa fosfato. Esta vía es activa en el hígado. Genera NADPH, necesario para la síntesis de ácidos grasos y colesterol, y ribosa-5-P, utilizada en la síntesis de nucleótidos.

Liberación de glucosa. El glucógeno almacenado en hígado es degradado a glucosa-6-P en la vía glucogenolítica. Glucogenólisis y gluconeogénesis son procesos por los cuales el tejido hepático genera glucosa-6-P; están sujetos a regulación, que los adecua a las necesidades del organismo (pág. 383).

La existencia de glucosa-6-fosfatasa en tejido hepático le permite hidrolizar glucosa-6-P y producir glucosa libre, que pasa a la circulación. Esto convierte al hígado en el principal órgano regulador de la glucemia y proveedor de combustible a los tejidos extrahepáticos durante períodos alejados de las comidas.

Gluconeogénesis. El lactato, principalmente producido por degradación de glucosa en músculo durante el ejercicio intenso, pasa a la sangre y es captado por el hígado, que lo oxida a piruvato y lo convierte en glucosa a través de las etapas de la gluconeogénesis. La conversión de lactato en glucosa exige un consumo de seis moles de ATP por mol de glucosa. La glucosa formada es liberada hacia la sangre y eventualmente vuelve al músculo, cerrando el llamado ciclo de Cori (pág. 280).

Lipogénesis. El excedente de glucosa no almacenado como glucógeno ni derivado hacia otras vías es utilizado, previa conversión en acetil-CoA, en la síntesis de ácidos grasos, triacilgliceroles, lípidos complejos y colesterol.

El glicerol-3-fosfato necesario para la síntesis de ácido fosfatídico, intermediario en la vía de formación de triacilgliceroles y glicerofosfolípidos, se genera por hidrogenación de dihidroxiacetonafosfato, metabolito de la vía glucolítica. La reacción es catalizada por la glicerolfosfato deshidrogenasa. La figura 20-1 resume los procesos descriptos.

Metabolismo de lípidos

El glicerol y los ácidos grasos de cadena menor de 10 carbonos ingresan al hígado por la vena porta, los lípidos simples y complejos, por la circulación general. Los triacilglicéridos sintetizados en células de la mucosa intestinal a partir de ácidos grasos, mono- y diacilgliceroles resultantes de la digestión de grasas neutras son incorporados en

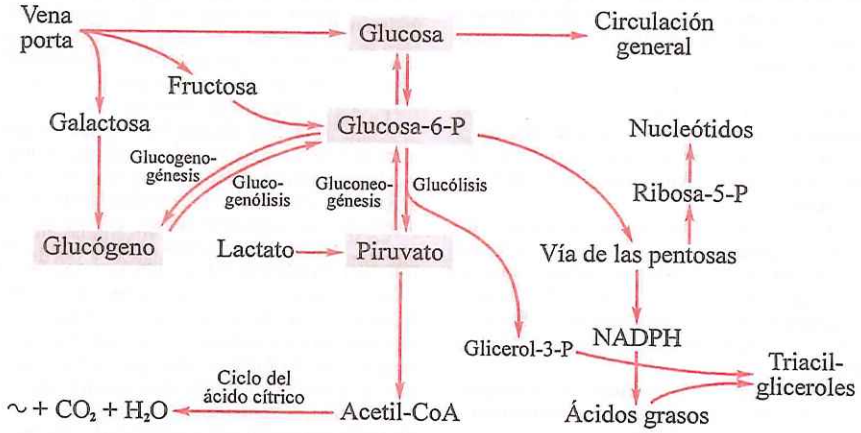


Fig. 20-1. Vías metabólicas de carbohidratos en hígado.

los quilomicrones y enviados a la circulación. Una vez en la sangre, estas partículas pierden la mayor parte de su contenido de triacilgliceroles en los capilares periféricos por acción de *lipoproteína lipasa*. Los remanentes de quilomicrones son captados por el hígado, que metaboliza sus lípidos.

Las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y las de baja densidad (LDL), con alta proporción de colesterol, se unen a receptores específicos de la membrana plasmática y son internalizadas por endocitosis. El colesterol liberado en el interior de la célula es empleado en la síntesis de ácidos biliares o incorporado a membranas. El excedente se esterifica y almacena en los hepatocitos.

Las principales vías metabólicas relacionadas con este grupo de sustancias en el hígado son:

Oxidación de ácidos grasos. La degradación de ácidos grasos a acetil-CoA por β-oxidación y la conversión final en CO_2 y H_2O en el ciclo del ácido cítrico rinden una importante cantidad de ATP, generada por fosforilación oxidativa. Los ácidos grasos constituyen la principal fuente de energía en el hígado.

Biosíntesis de ácidos grasos. Los ácidos grasos presentes en hígado provienen de: a) hidrólisis de triacilgliceroles de restos de quilomicrones captados por los hepatocitos; b) ácidos grasos libres que llegan por sangre unidos a albúmina, y c) síntesis en el propio órgano a partir de acetil-CoA, provisto por la degradación de ácidos grasos, glucosa y cadenas carbonadas de aminoácidos.

Los ácidos grasos son transferidos, activados como acil-CoA, a las posiciones 1 y 2 de glicerol-3-P para formar ácido fosfatídico. Este compuesto es precursor de triacilglicéridos y glicerofosfolípidos.

El glicerol-3-fosfato utilizado en estas síntesis se forma en hígado por reducción de dihidroxiacetonafosfato, intermediario de la glucólisis, y también por fosforilación del glicerol generado por hidrólisis de glicerolípidos del propio hígado, y del provisto por la circulación (procedente de la absorción en intestino o liberado en los capilares por acción de la lipoproteína lipasa).

Los triacilgliceroles son incorporados, junto con apoproteína B_{100} sintetizada en hígado, en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y enviadas a la circulación general.

El acetil-CoA engendrado por degradación de ácidos grasos y glucosa es utilizado en la síntesis de colesterol. El colesterol es el precursor de ácidos biliares, que se forman en hígado y desempeñan un importante papel en la digestión y absorción de grasas en intestino.

El hígado también sintetiza fosfolípidos para sus propias membranas y para exportación, junto con colesterol libre y proteínas apo A y apo C, formando los agrupamientos discoides de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) nacientes.

Formación de cuerpos cetónicos. El acetil-CoA no oxidado en el ciclo del ácido cítrico, o no utilizado en la síntesis de otros compuestos, forma cuerpos cetónicos, principalmente acetoacetato y 3-hidroxibutirato, que pasan a la sangre, de donde son captados por tejidos extrahepáticos con capacidad para utilizarlos como combustible. El hígado produce cuerpos cetónicos pero no puede emplearlos como fuente de energía pues carece de la enzima necesaria para activar el acetoacetato, la succinil-CoA-cetoácido-CoA transferasa (*tioforasa*) (pág. 305).

La figura 20-2 resume los procesos expuestos.

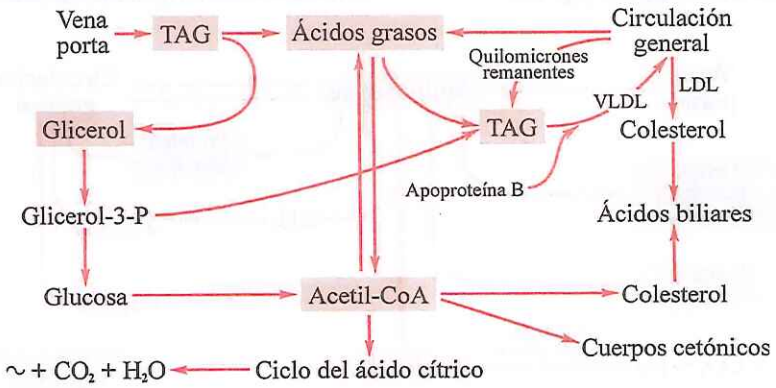


Fig. 20-2. Vías metabólicas de lípidos en el hígado. TAG: triacilglicéridos; LDL: lipoproteínas de baja densidad; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

Metabolismo de aminoácidos

Los aminoácidos absorbidos en intestino llegan al hígado por la vena porta. No existen mecanismos de almacenamiento semejantes a los descriptos para glucosa en hígado o para triacilgliceroles en tejido adiposo.

Biosíntesis de proteínas. Los aminoácidos libres son utilizados en la síntesis de proteínas, muy activa en hígado no sólo por el rápido recambio de proteínas propias del órgano, sino también porque en él se produce la mayor parte de las proteínas plasmáticas.

Degradación de aminoácidos. Los aminoácidos no utilizados para la síntesis de proteínas y otros productos nitrogenados (hemo, purinas, pirimidinas) son desaminados. Las enzimas que participan en reacciones de separación del grupo amina, como transaminasas y glutamato deshidrogenasa, presentan gran actividad en hígado; son inducidas por la presencia de sustrato o por hormonas (glucocorticoides).

Las cadenas carbonadas de aminoácidos, principalmente los no ramificados, son utilizadas por el hígado como fuente de energía. Dichas cadenas se convierten en acetil-CoA o en intermediarios del ciclo del ácido cítrico (pág. 340).

Además, el hígado tiene gran actividad gluconeogénica. La glucosa generada a partir de aminoácidos en hígado es liberada a la circulación y constituye un importante factor en el mantenimiento de la glucemia cuando el aporte de hidratos de carbono es escaso.

Ciclo glucosa-alanina. Este ciclo metabólico se establece entre músculo e hígado y contribuye a mantener la glucemia en los períodos que median entre las comidas (ver pág. 392).

Formación de urea. Los grupos amina transferidos en trasaminaciones y finalmente liberados como amoníaco (NH_3) en desaminaciones, principalmente de glutamato, ingresan en el ciclo de formación de urea.

El hígado es el único órgano que posee todas las enzimas necesarias para convertir un producto tóxico como NH_3 en urea (pág. 336), compuesto inocuo, muy soluble en agua y fácilmente excretable. En un adulto normal se producen entre 20 y 30 g de urea por día, que pasan a la sangre y se excretan por orina.

La figura 24-3 resume acciones del hígado relacionadas con el metabolismo de aminoácidos.

Biotransformación

El organismo está expuesto a una cantidad de productos diferentes de los nutrientes habituales. Entre estos productos se cuentan los fármacos administrados con fines terapéuticos, los contaminantes del ambiente y de los alimentos, tales como residuos de la combustión de carburantes, desechos industriales, pesticidas, herbicidas, conservadores y colorantes adicionados a los alimentos. Existen indicios de que algunos de esos compuestos poseen capacidad carcinogénica. Los productos de combustión del tabaco y otros tóxicos consumidos por adictos, son probadamente nocivos y deben ser considerados en este grupo de sustancias extrañas.

Los compuestos que el organismo no puede utilizar para generar energía o sintetizar sus propios componentes, ni incorporar a la economía metabólica de sus células, son llamados *xenobióticos*.

Como en general se trata de sustancias con efectos deletéreos sobre el organismo, éste pone en juego

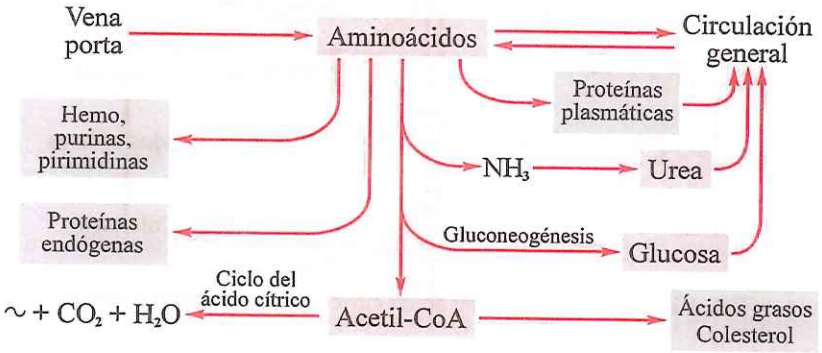


Fig. 20-3. Vías metabólicas de aminoácidos en el hígado.

acciones tendientes a modificarlos y eliminarlos, a las cuales se las ha llamado de *desintoxicación*, pero en algunos casos el producto resultante de las modificaciones producidas en las células suele ser más tóxico que el original, razón por la cual se considera más apropiado el nombre de *biotransformación*.

El hígado es el principal sitio donde ocurren las biotransformaciones. Las reacciones principales del metabolismo de sustancias extrañas son catalizadas por sistemas enzimáticos asociados al retículo endoplásmico de hepatocitos. En los procedimientos habituales de separación de organelas celulares, el retículo endoplásmico se obtiene en la llamada *fracción microsomal*.

La biotransformación de fármacos y otros compuestos extraños tiende a inactivarlos, es decir, a suprimir su capacidad para actuar sobre los procesos biológicos y a obtener productos más polares, de más fácil excreción por orina o por vía intestinal. Como se ha señalado, eventualmente pueden formarse intermediarios más tóxicos que el compuesto inicial. Sin embargo, habitualmente los productos finales de las transformaciones poseen escasa o nula actividad biológica. Debido a su mayor hidrosolubilidad, las sustancias resultantes prácticamente no penetran en las células; son vehiculizadas por sangre y excretadas por orina o por la bilis más eficientemente que el compuesto original.

Pese a la enorme variedad de estructuras químicas comprendidas en este grupo de sustancias, las reacciones a las cuales son sometidos los xenobióticos comprenden sólo oxidaciones, conjugaciones, reducciones e hidrólisis. Una sustancia puede sufrir una o más de esas transformaciones en su paso por el organismo.

Oxidación. Constituye la reacción más común y generalmente la primera que experimentan las sustancias extrañas incorporadas al organismo. Muchos compuestos alifáticos son totalmente oxidados y sus carbonos eliminados como CO_2. Sustancias aromáticas y esteroides son inicialmente hidroxilados. Este tipo de reacciones constituyen la llamada *fase I* del metabolismo de xenobióticos.

Las oxidaciones son catalizadas por oxidasas no específicas, integrantes de un sistema enzimático asociado al retículo endoplásmico, el *sistema oxidante de función mixta* o *sistema microsomal oxidante*. Requiere NADPH y oxígeno molecular. La molécula diatómica de oxígeno es dividida por introducción de dos electrones procedentes de NADPH; uno de los átomos de oxígeno se incorpora al sustrato y el otro forma agua. La fuente primaria de los electrones es NADPH, vía NADPH-citocromo P_{450} reductasa, flavoproteína con FAD y FMN que asegura el paso de los electrones al citocromo P_{450} de a uno por vez. El citocromo P_{450} es una hemoproteína de 45 kDa (P corresponde a pigmento y 450 a la longitud de onda en nm a la cual su absorbencia es máxima). En humanos se han identificado numerosos genes que codifican para citocromos P_{450}.

El sistema oxidante de función mixta es inducible. Su actividad aumenta notablemente en presencia de sustratos. El incremento de actividad es debido a estimulación de la síntesis de citocromo P_{450} y de los otros integrantes del sistema. Los barbitúricos son un ejemplo de fármacos que inducen la síntesis de enzimas del sistema oxidante. En pacientes tratados con barbitúricos en forma crónica se debe incrementar la dosis a medida que transcurre el tratamiento para obtener iguales efectos; además, adquieren mayor capacidad para inactivar otros fármacos. El alcohol es otro compuesto extraño, metabolizado en parte por el sistema microsomal. Los alcoholistas crónicos tienen mayor actividad de sistema microsomal oxidante y cuando están sobrios metabolizan algunos xenobióticos mucho más rápidamente que los individuos normales. Se requieren dosis más elevadas de sedantes o anestésicos para obtener el mismo efecto en alcoholistas que en personas normales.

Por otra parte, distintos compuestos que actúan como sustratos del sistema de oxidación del citocromo P_{450} muestran interacciones competitivas. Este fenómeno es importante y debe ser tenido en cuenta por el médico. Cuando se administran varios fármacos simultáneamente, si uno compite con otro/s por el sistema de oxidación, resulta una potenciación de los efectos, pues la metabolización de cada uno de ellos se hace más lenta que cuando se dan separadamente. Esto explica por qué, cuando un sujeto alcoholizado ingiere drogas, los riesgos de intoxicación aumentan notablemente. Ocurren muchos accidentes fatales por consumo de sedantes después de una abundante ingesta de bebidas alcohólicas. La competencia por el mismo sistema oxidante retarda la inactivación de ambos e incrementa sus efectos.

Conjugación. Corresponde a la llamada *fase II*. El xenobiótico, que a veces ya ha sufrido modificaciones por oxidación o hidrólisis, es combinado con un compuesto natural. Los compuestos más frecuentemente utilizados como agentes conjugantes son ácido glucurónico, glicina, cisteína, ornitina, glutamina, acetato, sulfato y metilo.

El ácido glucurónico interviene en reacciones de conjugación en su forma activa, el UDP-glucurónico. Su unión a otras sustancias es catalizada por *UDP-glucuronil transferasa*, enzima inducible.

La conjugación con ácido glucurónico no sólo se emplea en la biotransformación de sustancias extrañas, es también un proceso normal en el metabolismo de compuestos fisiológicos, como bilirrubina, hormonas esteroides y otros.

La conjugación con sulfato se realiza por transferencia desde fosfoadenosina fosfosulfato (PAPS), catalizada por *sulfoquinasa*. La acetilación, otro proceso utilizado en biotransformaciones, utiliza el acetato en su forma activa, acetil-CoA.

En capítulos anteriores se han citado ejemplos de conjugación con glicina (págs. 236 y 350).

Reducción e hidrólisis. Son menos frecuentes que las reacciones de oxidación y conjugación. El hígado posee enzimas que catalizan procesos de este tipo con diversos compuestos.

Excreción. Es la *fase III* o etapa final, en la cual las células expulsan el producto formado. Como, en general, aumenta la hidrofilia de los compuestos biotransformados, éstos requieren transportadores para atravesar las membranas. Intervienen aquí *proteínas de transporte de múltiples drogas*, del tipo ABC (pág. 217).

Variabilidad individual. Existen variantes genéticas de enzimas, transportadores y receptores que participan en la biotransformación de fármacos, de modo que no todos los individuos responden igualmente al tratamiento con un determinado medicamento o aun sufran efectos adversos. Esta variabilidad es estudiada por la farmacogenética.

Metabolismo de etanol

La ingesta de bebidas alcohólicas es un hábito frecuente en humanos. Los individuos normales tienen capacidad para metabolizar hasta 100 mg de etanol por kg de peso corporal por hora y convertirlos en productos inocuos. Por esta razón, una cantidad moderada, no mayor de 25 g diarios (dos vasos pequeños de vino), no produce desequilibrios. En cambio, el consumo de cantidades excesivas en forma aguda o crónica provoca graves alteraciones. El conocimiento del metabolismo de etanol ayuda a interpretar los efectos nocivos del alcoholismo.

La oxidación completa de etanol a CO_2 y H_2O produce 7,1 kcal (29,7 kJ) por gramo, rendimiento energético muy superior al de carbohidratos y proteínas (alrededor de 4 kcal o 17 kJ por g). Sin embargo, no debe considerarse por esto al alcohol como un nutriente natural.

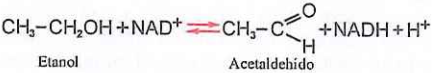
Absorción. La mayor parte del etanol ingerido se absorbe en duodeno y yeyuno; en menor proporción ingresa también por mucosa gástrica y resto del intestino. El proceso se efectúa por difusión pasiva. El alcohol es una molécula pequeña, soluble tanto en agua como en lípidos; atraviesa fácilmente las membranas y se distribuye con rapidez en todos los espacios hídricos del organismo. La absorción se completa a las dos horas de la ingesta; la presencia de alimentos en el estómago retarda el vaciamiento gástrico y disminuye la velocidad de absorción.

Excreción. Sólo 2 a 10% del etanol absorbido es eliminado sin cambio por orina, aire expirado y sudor; el resto es oxidado.

Metabolismo. El hígado es el principal órgano encargado de la metabolización del etanol. En él se cumplen las dos primeras etapas de oxidación que lo convierten en acetaldehído primero y acetato después.

Primera etapa. Puede realizarse por tres vías: a) alcohol deshidrogenasa, b) sistema microsomal oxidante y c) catalasa. Las tres dan acetaldehído como producto.

a) Alcohol deshidrogenasa. Esta oxidorreductasa ligada a NAD^+ cataliza la reacción:



La alcohol deshidrogenasa (ADH), localizada en el citosol de hepatocitos, es la principal responsable de la oxidación inicial de etanol en humanos. En personas normales más del 90% del etanol absorbido sigue esta vía. La ADH es una metaloenzima con zinc, formada por dos cadenas polipeptídicas de 40 kDa cada una. Se han descripto siete subunidades diferentes controladas por genes distintos. La enzima activa es un homo- o heterodímero de algunas de las cadenas, lo que da lugar a la existencia de formas múltiples o isozimas con diferentes propiedades cinéticas. Hay variantes genéticas de algunas de las subunidades que presentan frecuencias diferentes en distintos grupos raciales.

La ADH tiene amplia especificidad de sustrato; oxida una variedad de alcoholes alifáticos primarios, secundarios y terciarios y algunos alcoholes cíclicos.

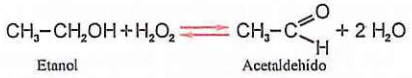
En el estómago también se encuentra actividad ADH. La oxidación de etanol en mucosa gástrica es un "primer paso" de su metabolismo; cuando se ingieren cantidades pequeñas ofrece una barrera protectora que reduce la carga de alcohol en el hígado.

b) Sistema microsomal oxidante de etanol (SMOE). Es una monooxigenasa u oxidasa de función mixta. Utiliza NADPH, citocromo P_{450} y O_2. El citocromo P_{450} del SMOE es el llamado CYP2E1 o, más simplemente, 2E1. No sólo cataliza la conversión de etanol en acetaldehído sino también utiliza

como sustratos muchos otros agentes hepatotóxicos. Está localizado en membranas del retículo endoplásmico de hepatocitos; el sistema es inducible. En individuos que consumen etanol en forma crónica su actividad aumenta de 4 a 10 veces.

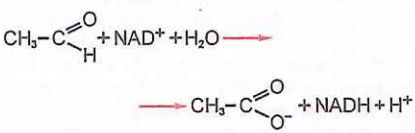
En personas normales la contribución del SMOE a la oxidación del alcohol es reducida (menos del 10%). En cambio, en alcoholistas crónicos puede dar cuenta del 30% o más del total metabolizado. La inducción del SMOE explica la mayor capacidad de individuos alcohólicos para oxidar diversos fármacos.

c) Catalasa. Esta enzima, presente en peroxisomas, es capaz de oxidar etanol si dispone de un sistema que genere peróxido de hidrógeno. La reacción de tipo peroxidasa puede representarse con la siguiente ecuación:



En condiciones fisiológicas, esta reacción no juega un papel significativo en el metabolismo del etanol.

Segunda etapa. El acetaldehído, producto de la oxidación del etanol, es altamente tóxico. Normalmente el hígado lo convierte rápidamente en acetato por acción de *acetaldehído deshidrogenasa* (ALDH) dependiente de NAD^+:



Existen dos isozimas de acetaldehído deshidrogenasa (ALDH), una localizada en mitocondrias y otra citosólica. La primera, de mayor afinidad para acetaldehído, es la más activa.

Se ha descrito un defecto genético responsable de la falta de actividad ALDH mitocondrial. Es relativamente frecuente en individuos de raza mongoloide. Los pacientes presentan intolerancia al etanol; basta la ingestión de cantidades reducidas de alcohol para desencadenar los síntomas de acumulación de acetaldehído que describiremos más adelante.

Oxidación final del acetato. El acetato producido en la reacción catalizada por ALDH pasa a la sangre y es captado por los tejidos, principalmente músculo, donde es activado por unión a coenzima A y puede seguir las vías del acetil-CoA, entre ellas oxidación hasta CO_2 y H_2O en el ciclo del ácido cítrico.

Otra alternativa metabólica. Se ha descripto otra vía de metabolización del etanol, no oxidativa. Consiste en la esterificación del alcohol con ácidos carboxílicos para formar ésteres etil-ácido graso (EEAG). Cataliza la reacción una *éster etil-ácido graso sintetasa*, particularmente activa en hígado y páncreas.

Consecuencias metabólicas del consumo exagerado de etanol. El consumo exagerado de etanol produce un exceso de equivalentes de reducción en hepatocito, primariamente como NADH. El equilibrio redox se desplaza; aumenta el valor de las relaciones NADH/NAD^+ y lactato/piruvato. Las principales consecuencias metabólicas de esta alteración son las siguientes: *a) Aumento de ácido láctico y de cuerpos cetónicos* (especialmente β-OH-butirato). Contribuye a la producción de acidosis. *b) Hiperuricemia.* El ácido láctico compite con la excreción de ácido úrico en riñón. *c) Reducción de la actividad del ciclo de ácido cítrico.* Hay menor disponibilidad de NAD^+. *d) Acumulación de ácidos grasos.* La sobrecarga de equivalentes de reducción procedentes del etanol deprime la oxidación de ácidos grasos en mitocondrias. Por otro lado, la reoxidación del exceso de NADH en mitocondrias puede determinar producción de especies reactivas de oxígeno. *e) Aumento de la lipogénesis hepática.* Los elevados niveles de NADH favorecen la producción de glicerol-3-fosfato a partir de dihidroxiacetonafosfato. La mayor oferta de glicerol-3-fosfato y ácidos grasos promueve la síntesis de triacilglicéridos. *f) Sobrecarga de los sistemas lanzadera.* El exceso de NADH citosólico procedente de las reacciones de ADH y ALDH satura los sistemas de transferencia de hidrógeno a mitocondrias. Entre otros efectos, se deprime la glucólisis. *g) Producción de hígado graso.* En una primera etapa, mientras el hígado no está afectado, aumenta la síntesis de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y el exceso de triacilglicéridos es exportado. Cuando el funcionalismo hepático se resiente, las grasas empiezan a acumularse en el órgano. *h) Efectos sobre la glucemia.* En alcoholistas crónicos con alimentación normal suele observarse hiperglucemia. Entre otras causas, ésta es debida a disminución en la utilización de glucosa y aumento de glucogenólisis estimulada por liberación de catecolaminas. En intoxicaciones alcohólicas agudas en cambio, se produce a veces hipoglucemia severa, especialmente en personas mal alimentadas, sin reserva de glucógeno. En parte contribuye también a la hipoglucemia el bloqueo de la gluconeogénesis coexistente en estos pacientes. *i) Efectos sobre sistema nervioso.* El consumo crónico de etanol perturba funciones neuroquímicas y suele llevar a daños estructurales. Los principales efectos son ejercidos sobre la

materia blanca; se ha demostrado atrofia cerebral, principalmente de los lóbulos frontales, lo cual es causa de alteraciones de funciones cognitivas.

El acetaldehído afecta la acción de neurotransmisores como glutamato, γ-amino butirato y otros. Los eventuales efectos en la conducta son debidos en parte a interferencia con vías de transducción de señales y canales de iones.

La intoxicación alcohólica aguda produce inconsciencia, depresión del centro respiratorio, edema cerebral y congestión vascular, a veces con hemorragia focal subaranoidea.

Toxicidad del acetaldehído. El producto formado en la primera etapa de oxidación de etanol debe su acción deletérea, en parte, a su capacidad de formar complejos con proteínas; inactiva enzimas, disminuye la actividad de reparación de ADN y favorece la formación de anticuerpos contra las proteínas complejadas. También favorece la reducción del glutatión y facilita la acción de radicales libres y peroxidación de lípidos.

La inhibición competitiva de acetaldehído deshidrogenasa por disulfiram (antabuse) ha sido utilizada en el tratamiento de pacientes alcoholistas. La administración de disulfiram produce aumento de los niveles de acetaldehído después de la ingesta de etanol y con ello se acentúan los síntomas desagradables inducidos por ese metabolito: vasodilatación periférica, enrojecimiento de la piel, náuseas, cefaleas, vómitos. El propósito es inducir en el sujeto la aversión por el alcohol.

Tolerancia al etanol. En los alcoholistas crónicos ha sido atribuida a adaptaciones del sistema nervioso central. Además juega un papel la inducción y aumento de actividad del SMOE, que explica también la mayor tolerancia a muchos fármacos. Como el etanol y algunos xenobióticos compiten por el mismo sistema, el principal efecto de la presencia aguda de etanol es la inhibición del metabolismo de fármacos; disminuye la tasa de su eliminación, prolonga su permanencia en el organismo y potencia su acción.

El citocromo P_{450} 2E1 tiene capacidad para convertir xenobióticos en metabolitos tóxicos. Solventes industriales (bromobenceno, cloruro de vinilideno), anestésicos (enflurano), medicamentos (isoniacida, fenilbutazona), drogas (cocaína) y analgésicos de venta libre (acetaminofeno) son sustratos e inductores de 2E1; su metabolización genera productos tóxicos. Debido a la mayor actividad del SMOE, los alcoholistas crónicos tienen mayor riesgo de daño hepático por esos xenobióticos que las personas normales. La administración simultánea de esos productos con etanol, sumada a las deficiencias de alimentación comunes en alcoholistas, potencian los efectos nocivos. Es común la disminución de los niveles de glutatión reducido (GSH) y el aumento de la producción de radicales libres. El consumo crónico de etanol acrecienta el estrés oxidativo y daña las mitocondrias hepáticas. Las especies reactivas de oxígeno promueven inactivación de enzimas y peroxidación de lípidos, factores que contribuyen a la producción de fibrosis y pueden favorecer el desarrollo de cirrosis hepática. También se ha asociado el abuso de alcohol a una mayor incidencia de cáncer de tractos digestivo superior y respiratorio. La mayor actividad de citocromo P_{450} 2E1 sería responsable de la producción de agentes cancerígenos. Otro factor contribuyente es la deficiencia de vitamina A.

La vía no oxidativa produce ésteres etil-ácido graso (EEAG) que, en alcoholistas crónicos, se van acumulando en membranas (plasmática y de organelas) y las desestabiliza.

Los EEAG y metabolitos tóxicos generados por la actividad de CYP2E1 pueden activar algunas quinasas del sistema MAPK, como ERK (quinasa regulada desde el exterior) y JNK (quinasa c-Jun N-terminal) y también al factor nuclear κB (FNκB). También pueden comprometer al receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR) (pág. 488).

Estas acciones afectan factores de transcripción y eventualmente causan perturbación de la actividad génica, que algunos autores han vinculado a la producción de inflamación y esteatosis en hígado.

Intoxicación con metanol. El metanol es un compuesto causante de intoxicaciones muy graves, particularmente por la ingestión de bebidas adulteradas por adición de esa sustancia. El metanol es oxidado en hígado por la alcohol deshidrogenasa que cataliza la primera etapa de metabolización de etanol. El producto formado es formaldehído, mucho más tóxico que el acetaldehído. Causa serias lesiones en sistema nervioso; las alteraciones en el nervio óptico llevan a la ceguera. Una de las medidas terapéuticas aconsejadas si se toma la intoxicación tempranamente es la administración de etanol. Al competir con el metanol por la ADH, se reduce la cantidad de formaldehído formado y se lo reemplaza por acetaldehído, menos tóxico.

MÚSCULO ESQUELÉTICO

El músculo es una máquina capaz de convertir energía química en energía mecánica. Su metabolismo está predominantemente orientado a generar ATP, fuente directa de la energía que se transforma en trabajo.

Metabolismo del músculo

El ATP es la fuente directa de energía, no sólo para la contracción, sino también para la relajación muscular. Del total de ATP consumido por el organismo en reposo, cerca del 30% es utilizado por la masa muscular. Durante un ejercicio intenso, el porcentaje requerido por los músculos puede llegar al 90% del total. Para atender estas exigencias el metabolismo del músculo está fundamentalmente orientado a proveer ATP.

A diferencia de otros tejidos que realizan una actividad continua, con variaciones poco marcadas en condiciones fisiológicas, el músculo esquelético se caracteriza por la intermitencia o discontinuidad de su acción; del reposo puede pasar rápidamente a condiciones de actividad extrema. Ello tiene su correlación metabólica.

El aumento de actividad requerido por el ejercicio físico no se limita al músculo; compromete también a otros órganos, especialmente corazón y aparato respiratorio, cuyo trabajo se incrementa, y al hígado y tejido adiposo, que proveen combustibles.

El músculo en reposo recibe con la sangre que lo irriga ácidos grasos libres unidos a seroalbúmina, glucosa y cuerpos cetónicos procedentes del hígado. Estos sustratos son oxidados para satisfacer los requerimientos energéticos basales (de reposo) y formar las reservas de ATP y creatinafosfato (pág. 351). La glucosa es almacenada en forma de glucógeno (hasta 1% del peso total del músculo); también se deposita una moderada reserva de triacilgliceroles.

El metabolismo del músculo en actividad debe atender dos situaciones diferentes: a) ejercicio muy intenso y breve (un trabajo máximo no puede sostenerse por más de 3 minutos); b) ejercicio submáximo, que se mantiene durante períodos prolongados (horas). En el primer caso, la provisión de O_2 y combustibles por sangre y la fosforilación oxidativa no son suficientes para mantener el ritmo de consumo de ATP. En consecuencia, el ejercicio se realiza fundamentalmente gracias a la producción anaeróbica de ATP y utilización de las reservas propias de glucógeno. En el segundo caso, el trabajo se sostiene durante tiempos más prolongados, porque el ATP se genera aeróbicamente y el aprovechamiento del combustible es más eficiente.

Los términos anaerobio y aerobio deben tomarse aquí en sentido relativo, pues no existen situaciones absolutamente anaerobias o aerobias. Aun en el más intenso ejercicio, existe alguna contribución aerobia, así como en el trabajo muscular

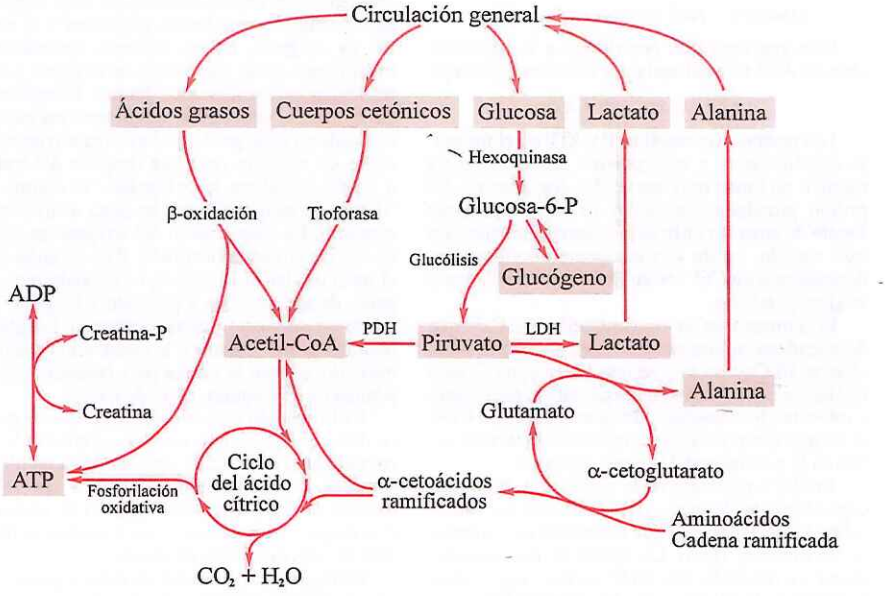


Fig. 20-4. Vías metabólicas en el músculo esquelético.

aerobio puede existir un componente anaeróbico. En realidad se pretende indicar cuál es el mecanismo predominante en la generación de ATP.

Los ejemplos más típicos los brindan ciertas pruebas atléticas; las carreras de 100 a 200 m llanos son esfuerzos máximos y breves, realizados casi exclusivamente con ATP engendrado anaeróbicamente, mientras las carreras de largo aliento, notablemente la de maratón (42,2 km), constituyen ejercicios aeróbicos.

Se analizarán los cambios metabólicos que ocurren durante el trabajo muscular máximo (anaerobio) y el submáximo (aerobio).

Trabajo anaeróbico. Para realizar un trabajo muy intenso, de corta duración, el músculo utiliza sus reservas de ATP y genera ATP por degradación anaeróbica de su propio glucógeno.

Cuando el músculo comienza un ejercicio de gran intensidad, la demanda de ATP puede incrementarse de 100 a 1.000 veces. Esta demanda no puede ser provista por fosforilación oxidativa, ya que el aporte de O_2 y combustible por sangre no aumenta en igual proporción.

En la etapa inicial del trabajo muscular, el ATP es generado por las reservas de creatina-fosfato, compuesto cuya energía de hidrólisis es de –10,3 kcal/mol (–43,1 kJ/mol) y puede ceder fosfato a ADP para formar ATP en una reacción catalizada por *creatinafosfato quinasa*:

$$\text{Creatina-P} + \text{ADP} \rightleftharpoons \text{Creatina} + \text{ATP}$$

Otra reacción que contribuye a la regeneración de ATP es catalizada por *adenilato quinasa*:

$$2\,\text{ADP} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{AMP}$$

Las reservas de creatina-P y ATP en el músculo son limitadas y sólo pueden proveer energía durante un lapso muy breve. La degradación del propio glucógeno muscular es una importante fuente de sustrato utilizable anaeróbicamente. En este sentido, existe una excelente coordinación, dependiente de Ca^{2+}, entre la función mecánica y la glucogenólisis.

El aumento de la concentración de Ca^{2+} que desencadena la contracción muscular tiene otros efectos. El Ca^{2+} no sólo se une a troponina C, sino también a calmodulina, que estimula la *fosforilasa* e inicia la glucogenólisis. De esta manera, el Ca^{2+}, al tiempo que provoca la contracción muscular, estimula la provisión del sustrato necesario.

También participa en la activación de la glucogenólisis la descarga de *catecolaminas* (adrenalina y noradrenalina) que acompaña al comienzo de un esfuerzo físico. La acción de las catecolaminas es mediada por *AMP cíclico*, cuyo nivel aumenta en la célula muscular en actividad.

La contracción muscular produce rápida disminución de la concentración de ATP en músculo y aumento de ADP y AMP. Estos cambios activan alostéricamente la *fosforilasa b*. Por otra parte, también estimulan la *fosfofructoquinasa* y con ello la glucólisis.

Como durante un esfuerzo muscular máximo los requerimientos de ATP exceden largamente las posibilidades de regeneración por fosforilación oxidativa a partir del O_2 y sustratos que llegan por sangre, debe recurrirse a la glucólisis, con producción de dos moléculas de ATP y dos de lactato por cada una de glucosa degradada.

La glucólisis alcanza gran actividad, hasta consumir los depósitos de glucógeno del músculo. Esto explica por qué el ejercicio intenso no puede sostenerse más de pocos minutos. Pero el principal factor limitante del esfuerzo es la acumulación de lactato en el músculo. Aunque el flujo sanguíneo aumenta durante el ejercicio, no es suficiente para acarrear todo el lactato formado. Se produce una caída del pH local hasta valores próximos a 6,6. A este pH, la fosfofructoquinasa es más sensible a inhibición por efectores alostéricos y se reduce la actividad glucolítica. Además el H^+ compite con el Ca^{2+} por unirse a la troponina C. Al desplazarse el Ca^{2+} de la troponina, disminuye la fuerza de la contracción.

Deuda de oxígeno. Durante el ejercicio aumentan la frecuencia cardíaca, el flujo sanguíneo en músculo, la ventilación pulmonar y el consumo de oxígeno. En un esfuerzo anaeróbico, el incremento en la captación de oxígeno por los músculos es insuficiente, durante la realización del ejercicio, para oxidar totalmente los sustratos utilizados, razón por la cual el aumento en el consumo de oxígeno continúa después del trabajo, a fin de completar la oxidación. Se contrae una "deuda de oxígeno", que se paga al finalizar el ejercicio. La mayor parte del oxígeno se emplea en oxidar el lactato formado. Este difunde desde el músculo hacia la sangre, es captado por el hígado, donde se oxida a piruvato y luego se convierte en glucosa (gluconeogénesis). La glucosa liberada por el hígado a la circulación vuelve al músculo, el cual la utiliza para regenerar sus depósitos de glucógeno (ciclo de Cori).

La liberación de catecolaminas que se produce durante el ejercicio no sólo promueve la glucogenólisis en músculo, sino también en hígado. El nivel de esas hormonas vuelve a sus valores basales unos 5 o 6 minutos después de terminado el trabajo y durante ese lapso continúa la liberación de glucosa desde el hígado.

En reposo, la oxidación de ácidos grasos, glucosa y cuerpos cetónicos (predominantemente los

primeros) genera el ATP necesario para restablecer los depósitos de creatinafosfato y glucógeno. El hígado recompone su reserva de glucógeno, en parte utilizando lactato que le llega desde el músculo.

Trabajo aerobio. Cuando el ejercicio es de menor intensidad, el aporte de O_2 puede ser suficiente para generar por fosforilación oxidativa el ATP requerido.

La intensidad máxima de trabajo que puede mantenerse mediante la producción aeróbica de ATP depende de la capacidad de oxidación del tejido. El límite es impuesto por la cantidad de O_2 que la sangre libera y los músculos pueden utilizar por unidad de tiempo. La *tasa máxima de captación de oxígeno* (Vo_{2max}) corresponde a ese límite; en adultos jóvenes alcanza valores entre 40 y 50 mL de O_2/min/kg de masa corporal.

Cualquier ejercicio que requiera una cantidad de oxígeno mayor que la Vo_{2max} debe recurrir, al menos parcialmente, a la generación de ATP por vía anaeróbica, lo cual implica consumir glucógeno muscular.

Las cantidades de combustible almacenadas en el propio músculo son limitadas e insuficientes para sostener un trabajo prolongado aun en condiciones aeróbicas, en las cuales el rendimiento energético del combustible es mucho más elevado. Durante un ejercicio sostenido, el músculo utiliza aeróbicamente sustratos provistos por sangre, como glucosa, ácidos grasos y cuerpos cetónicos procedentes del hígado, o ácidos grasos movilizados de las reservas del tejido adiposo; pero también recurre a sus propias reservas de glucógeno y triacilgliceroles. El ingreso de glucosa al músculo se realiza principalmente a través de transportadores GLUT4, de alta afinidad, cuyo número en la membrana aumenta por acción de insulina.

La limitación en la capacidad de trabajo aeróbico está dada por la cantidad máxima de oxígeno que puede proveer la sangre circulante. Desde el punto de vista del consumo de oxígeno, el combustible más eficiente será el que genere mayor cantidad de moléculas de ATP por moléculas de oxígeno consumido. Si se compara la oxidación de glucosa con la de un ácido graso:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O + 38\,ATP$$

Glucosa

$$C_{18}H_{36}O_2 + 26O_2 \longrightarrow 18\,CO_2 + 18\,H_2O + 146\,ATP$$

Ácido esteárico

La generación de energía por molécula de oxígeno es alrededor de 11% mayor cuando se oxida glucosa que cuando se consumen ácidos grasos. Por esta razón, cuando el ejercicio aeróbico se realiza a una intensidad cercana a la tasa máxima de captación de oxígeno (>90% Vo_{2max}) se usa preferentemente glucosa y se consume glucógeno muscular.

Por otra parte, si se considera el rendimiento de ATP por unidad de masa de combustible, los ácidos grasos son 30 a 50% más eficientes que la glucosa.

En ejercicios en los cuales el consumo de O_2 es de 60% o menos del valor Vo_{2max} se utilizarán preferentemente ácidos grasos, lo cual permite un mayor rendimiento del combustible y un trabajo sostenido por más tiempo, ya que las reservas de grasas son notablemente más abundantes que las de glucógeno. A medida que el consumo de oxígeno se aproxima a la Vo_{2max}, aumenta progresivamente la proporción de ATP generado a partir de la oxidación de glucosa a fin de mejorar el rendimiento del oxígeno consumido.

La oferta de combustible al músculo durante el ejercicio es regulada por acción de un conjunto de hormonas. Cuando el esfuerzo muscular alcanza cierta intensidad, se produce liberación de catecolaminas. Además de estimular la actividad cardíaca, dichas hormonas activan la glucogenólisis muscular, la lipólisis en tejido adiposo y contribuyen a activar la glucogenólisis hepática. La magnitud del aumento de catecolaminas en plasma es proporcional a la intensidad y duración del ejercicio. Otra modificación hormonal notable es la disminución de los niveles de insulina en plasma, lo cual reduce la síntesis de glucógeno, ácidos grasos y triacilgliceroles. Durante ejercicios prolongados, o también en trabajos breves pero muy intensos, se produce además liberación de glucagón, cortisol y somatotrofina. Estas hormonas estimulan la glucogenólisis y gluconeogénesis en hígado y la lipólisis en tejido adiposo.

La gluconeogénesis hepática utiliza como sustratos iniciales principalmente lactato y alanina, ambos derivados del piruvato en músculo. La oxidación de piruvato en músculo es deprimida cuando se utilizan ácidos grasos y cuerpos cetónicos, ya que el acetil-CoA formado durante la degradación de estos sustratos inhibe la piruvato deshidrogenasa.

Los α-cetoácidos derivados de aminoácidos de cadena ramificada son preferentemente degradados y utilizados como combustible en el músculo.

La alanina se produce en músculo por transaminación entre piruvato y glutamato; la alanina pasa a la sangre y es tomada por el hígado, donde se completa el ciclo glucosa-alanina (pág. 392). El otro producto de dicha reacción, α-cetoglutarato, transamina con aminoácidos.

Durante una actividad prolongada (consumo submáximo de O_2) como la de un corredor de maratón se utilizan glucógeno y triacilgliceroles del propio músculo, ácidos grasos libres llegados por sangre, originados principalmente por hidrólisis de triacilgliceroles de tejido adiposo, y glucosa y cuerpos cetónicos liberados hacia la circulación por el hígado.

En las primeras fases del trabajo predomina la oxidación de glucosa derivada del glucógeno muscular y, en parte, del hepático; la estimulación de la lipólisis pronto hace que aumente el aporte y consumo de ácidos grasos, con el consiguiente ahorro en la oxidación de glucosa. Cuando el ejercicio continúa por más de dos horas, la oxidación de ácidos grasos y cuerpos cetónicos predomina marcadamente y se previene la utilización de glucosa. En pruebas de esfuerzo submáximo prolongadas por más de 6 horas, se ha comprobado que aún subsiste una proporción importante de glucógeno en el músculo, como evidencia del efecto de ahorro que la oxidación de ácidos grasos tiene sobre el consumo de glucosa. La disponibilidad de glucógeno en el músculo es uno de los factores que determinan la duración del esfuerzo. Cuando se agotan los depósitos de glucógeno, el ejercicio debe ser reducido en intensidad o detenido.

Efecto del entrenamiento. En un sujeto entrenado físicamente aumenta la síntesis de proteínas en músculo esquelético y cardíaco y se incrementa la vascularización del tejido muscular. La hipertrofia del miocardio mejora el suministro de sangre a los tejidos periféricos. En el músculo esquelético se duplica o triplica el número de mitocondrias, lo cual aumenta notablemente la capacidad para oxidar sustratos. El contenido de mioglobina se incrementa y, por ende, también la capacidad de almacenamiento y transporte de O_2 en el músculo. Gracias a estas modificaciones, los valores de Vo_{2max} del músculo entrenado son dos o más veces mayores que los del no ejercitado.

El músculo entrenado tiene mayor capacidad para utilizar ácidos grasos y cuerpos cetónicos, lo cual reduce el consumo de glucógeno muscular y la producción de lactato, lo que retarda la aparición de fatiga. La mayor vascularización del músculo no sólo mejora la provisión de O_2 y combustible, sino que permite la remoción más eficiente del lactato y su transporte al hígado para la reconversión en glucosa. Todo ello resulta en mayor resistencia y más rápida recuperación después del trabajo.

Los efectos del ejercicio comprenden una marcada readecuación molecular y metabólica del músculo, resultado de una compleja interacción de muchos sistemas de transducción de señales que determinan regulación de la transcripción y traducción y con ello de la síntesis de proteínas.

Según sus características fisiológicas (velocidad de contracción) y metabólicas (capacidad oxidativa), se distinguen tres tipos de fibras musculares: I, IIA y IIB. Las fibras de tipo I son de contracción lenta y su metabolismo es predominantemente aeróbico. Las fibras IIB se contraen rápidamente y tienen alta capacidad glucolítica. Las de tipo IIA muestran propiedades intermedias.

Algunos animales tienen músculos constituidos casi exclusivamente por un solo tipo de fibras. Los llamados músculos blancos, como el pectoral de las aves de corral y el abdominal de los peces, contienen prácticamente sólo fibras IIB. Estos músculos se contraen con fuerza y rapidez, pero sólo durante períodos breves; se fatigan con facilidad. Tienen muy pocas mitocondrias y obtienen energía de la degradación glucolítica de su propio glucógeno. Las fibras de tipo I son las predominantes en músculo rojo, que debe su color al alto contenido de mitocondrias, citocromos y mioglobina. La energía es suministrada principalmente por la oxidación de ácidos grasos y pueden sostener su actividad durante largo tiempo. En el ser humano, el tejido muscular contiene siempre una mezcla de los tres tipos de fibras, aunque la proporción varía en distintos músculos y en diferentes individuos.

MÚSCULO CARDÍACO

La estructura de las fibras del músculo cardíaco, así como el mecanismo de su contracción, son similares a los descriptos para músculo esquelético. La principal característica diferencial del miocardio es su actividad continua, que se cumple gracias a energía generada aeróbicamente. La gran cantidad de mitocondrias existentes en músculo cardíaco indica la capacidad de este tejido para oxidar sustratos y producir ATP por fosforilación oxidativa. El corazón tiene un contenido relativamente bajo de ATP y una elevada actividad de hidrólisis, aun en reposo, razón por la cual la regeneración de ATP debe ser muy activa.

Sólo en casos de actividad física muy intensa, el corazón recurre a la glucólisis anaerobia como fuente de ATP adicional. El tejido cardíaco dispone de una pequeña reserva de glucógeno, degradado en esas circunstancias con formación de lactato. Cuando el sujeto está en reposo, o en ejercicio moderado, el miocardio utiliza ácidos grasos como combustible principal. Además, oxida glucosa, cuerpos cetónicos y lactato que le llegan por sangre. Estos sustratos son degradados hasta CO_2 y H_2O en el ciclo del ácido cítrico.

Alteraciones metabólicas, ya sea por exceso de ácidos grasos y de la β-oxidación, como en la obesidad o en la diabetes, o deficiencias de la oxidación que ocurren en cuadros de isquemia o insuficiencia cardíacas, contribuyen a la patología del corazón.

El ingreso de glucosa a las células del miocardio se hace principalmente por transportadores GLUT4, cuya inserción en la membrana plasmática es estimulada por insulina.

Cuando el esfuerzo físico aumenta, también se incrementa la actividad cardíaca. A medida que ésta crece, también lo hace el consumo de glucosa, lo cual, como se ha señalado anteriormente, permite un mayor rendimiento energético del oxígeno.

El consumo de glucosa en aerobiosis exige el funcionamiento de conmutadores de hidrógeno que transfieren equivalentes reductores desde el sarcoplasma a las mitocondrias. En corazón, la lanzadera aspartato-malato (pág. 185) es la más activa. El glutamato necesario para su funcionamiento se forma por transaminación con α-cetoglutarato, intermediario del ciclo del ácido cítrico.

El metabolismo de aminoácidos es más intenso en músculo cardíaco que en el esquelético. Posee también mayor actividad de síntesis de proteínas. El trabajo muscular metódico y continuado, como el del entrenamiento deportivo, produce incremento en la síntesis de proteínas e hipertrofia del tejido contráctil. También se produce hipertrofia del tejido muscular cardíaco adyacente a áreas que han sufrido un infarto o lesión consecutiva a la falta de irrigación en una zona del corazón. El bloqueo de vasos sanguíneos del sistema arterial coronario lleva rápidamente a alteraciones irreversibles y a la muerte (necrosis) del tejido cardíaco comprometido, ya que éste depende exclusivamente de un metabolismo aerobio y no tolera la falta de oxígeno.

TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo se halla ampliamente distribuido, en particular en el celular subcutáneo y perivisceral; representa alrededor del 25% de la masa corporal de un adulto normal (el porcentaje es mayor en la mujer que en el varón).

Los adipocitos, células propias de este tejido, contienen una mezcla de triacilgliceroles que ocupa la casi totalidad del citoplasma.

Se estima en 15 kg la cantidad total de triacilgliceroles almacenados en el tejido adiposo de un adulto, lo cual constituye la mayor reserva energética del organismo, equivalente a 140.000 kcal o 585.000 kJ (9,3 kcal o 39 kJ por g de grasa). Es fácil advertir la importancia de este depósito si se lo compara con el de glucógeno, de unos 225 g, repartidos principalmente entre hígado y músculo, cuyo equivalente en energía es de 900 kcal o 3.760 kJ (4 kcal o 16,7 kJ por g).

Las grasas tienen gran ventaja sobre los carbohidratos como material de reserva energética. Por unidad de masa poseen más del doble de valor calórico; por otro lado, debido a su escasa polaridad, los triacilgliceroles pueden ser almacenados en las células sin agua acompañante, mientras el glucógeno, altamente hidrófilo, atrae una cantidad de agua que duplica su masa. Si la energía contenida en 15 kg de grasas se depositase como glucógeno, la masa corporal aumentaría en unos 60 kg.

El tejido adiposo no constituye un depósito inerte; posee una intensa actividad metabólica. El permanente recambio de las grasas acumuladas contribuye a la provisión de combustible a los restantes tejidos (a excepción del sistema nervioso central y eritrocitos, que no utilizan ácidos grasos).

Se considerarán aquí sólo las principales vías metabólicas funcionantes en adipocitos (fig. 20-5).

La glucosa ingresa a la célula adiposa desde la sangre por un proceso de difusión facilitada estimulado por insulina (transportadores GLUT4). Dentro de la célula, la hexoquinasa cataliza la formación de glucosa-6-P. Las dos principales alternativas metabólicas de este intermediario en el adipocito son la glucólisis y la vía de pentosa fosfato.

En la vía glucolítica, la glucosa-6-P es degradada a piruvato; este producto se descarboxila oxidativamente a acetil-CoA, oxidado a CO_2 y H_2O en el ciclo del ácido cítrico para producir energía. Cuando la provisión de glucosa es abundante, se la utiliza también para sintetizar ácidos grasos. En la vía de pentosa fosfato, activa en tejido adiposo, se genera NADPH necesario en la síntesis de ácidos grasos.

Por la sangre llegan al adipocito ácidos grasos procedentes de la hidrólisis de triacilgliceroles de quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), catalizada por lipoproteína lipasa en los capilares. Los ácidos grasos son activados a acil-CoA en adipocitos y siguen la vía de síntesis de triacilgliceroles o son degradados por β-oxidación a acetil-CoA primero y finalmente hasta CO_2 y H_2O en el ciclo del ácido cítrico con importante producción de ATP.

Los ácidos grasos provistos por la circulación y los sintetizados en la propia célula a partir de glucosa son utilizados para la síntesis de triacilgliceroles, que se almacenan como reserva. Para esta síntesis se requiere glicerol-3-fosfato además de acilCoA. El adipocito no tiene capacidad

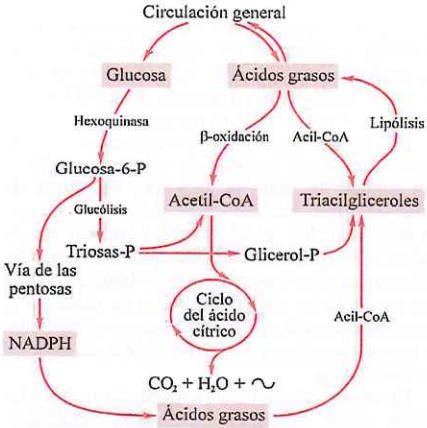


Fig. 20-5. Vías metbólicas en tejido adiposo.

para fosforilar glicerol, razón por la cual no puede utilizar el glicerol liberado por la hidrólisis de grasas de quilomicrones, de VLDL y del propio tejido adiposo. El glicerol-3-fosfato se genera por reducción, catalizada por glicerolfosfato deshidrogenasa, de dihidroxiacetonafosfato, una de las triosas fosfato formadas en la vía glucolítica. De esta manera, la glucosa contribuye a la lipogénesis, no sólo con acetil-CoA para la síntesis de ácidos grasos, sino también con glicerol-3-P.

Los triacilgliceroles almacenados son rápidamente renovados; su vida media es de unos 5 días. Cuando los tejidos requieren combustible, se produce movilización de las reservas de grasas. Una lipasa propia del tejido adiposo, regulada por hormonas, cataliza la hidrólisis de triacilgliceroles. Los ácidos grasos liberados pasan a la sangre, en la cual son vehiculizados unidos a albúmina. La lipasa de los adipocitos es activada por fosforilación catalizada por proteína quinasa A (PKA) dependiente de AMP cíclico.

La PKA también fosforila a las *perilipinas*, familia de proteínas localizadas en la superficie de la gotita de lípidos de cada adipocito. Cuando estas proteínas no están fosforiladas forman una barrera que impide el ataque de la lipasa a los triacilglicéridos. Se requiere la acción de la quinasa sobre la lipasa y las perilipinas para que la lipólisis comience.

Noradrenalina, adrenalina, glucagón, glucocorticoides, somatotrofina y adrenocorticotrofina, al fijarse sobre receptores específicos asociados a proteínas G_S en la membrana de las células adiposas, determinan aumento de los niveles de AMP cíclico y activación de la lipasa. Por otro lado, insulina y prostaglandina E_1 la deprimen.

La figura 20-5 resume los conceptos expuestos.

TEJIDO NERVIOSO

El sistema nervioso central (SNC) posee características metabólicas notables. Pese a tener una masa menor al 2,5% de la masa corporal de un adulto normal, consume un quinto (20%) del total de oxígeno utilizado en condiciones de reposo. Por otra parte, en personas normales, bien alimentadas, el SNC sólo emplea glucosa como combustible, según lo indica el valor 1 de su *relación de intercambio respiratorio*.*

La glucosa ingresa a las células nerviosas predominantemente a través de transportadores GLUT3 no dependientes de insulina; son portadores de alta afinidad que aseguran provisión de sustrato aun a bajos niveles de glucemia. Por acción de hexoquinasa se forma glucosa-6-P, que se degrada hasta piruvato en la vía glucolítica o de Embden-Meyerhof. El piruvato se descarboxila a acetil-CoA y finalmente es oxidado a CO_2 y H_2O en el ciclo de Krebs de ácidos tricarboxílicos, con la consiguiente producción de ATP por fosforilación oxidativa.

La glucosa es prácticamente la única fuente de energía en el sistema nervioso. Sólo en condiciones de inanición o ayuno prolongado el cerebro desarrolla capacidad para utilizar además cuerpos cetónicos (β-hidroxibutirato).

El consumo de glucosa por el SNC no muestra cambios importantes durante las 24 horas del día; se mantiene en niveles relativamente constantes, ya sea durante el sueño o la vigilia, el reposo o la actividad intelectual.

Como el cerebro no posee reservas de glucógeno, depende en todo momento del suministro de glucosa por vía sanguínea. Con niveles de glucemia de 80 o más mg por dL, el SNC tiene asegurada una provisión adecuada de combustible. El hígado, a través de los procesos de glucogenólisis y gluconeogénesis, es el principal encargado de mantener la homeostasis de la glucosa. Un

* La relación de intercambio respiratorio, también designada cociente respiratorio, es el cociente entre moles de CO^2 producidos y los de O^2 consumidos (moles CO^2/moles O^2). El valor de la relación varía según el tipo de nutriente metabolizado; para glucosa es 1; grasas, 0,7 de promedio; proteínas, 0,8. La combustión de los alimentos provistos por la dieta mixta, con carbohidratos, grasas y proteínas en proporciones adecuadas, da un cociente respiratorio promedio de 0,82.

conjunto de hormonas participan en la regulación de los niveles de glucemia (pág. 544).

Descensos pronunciados en la concentración de glucosa en sangre afectan el funcionamiento del sistema nervioso. Una glucemia de 40 mg por dL produce síntomas neurológicos (mareos, lipotimias); valores más bajos pueden llevar al coma y a daños irreversibles.

Además de glucosa, la sangre provee el oxígeno necesario para su catabolismo hasta CO_2 y H_2O. De allí la gran sensibilidad del SNC a fallas en la irrigación sanguínea. Un bloqueo vascular, aun de pocos minutos de duración, puede producir alteraciones irreparables en cerebro.

Del total de ATP generado por el sistema nervioso en su metabolismo oxidativo, aproximadamente dos terceras partes son empleadas en mantener el potencial de membrana de las neuronas; el resto se utiliza en trabajo de síntesis, principalmente de neurotransmisores y proteínas.

Impulso nervioso

En células nerviosas no estimuladas, el interior es electronegativo con respecto al exterior. Esta diferencia de voltaje constituye el llamado *potencial de reposo* y se debe a la desigual distribución de iones a ambos lados de la membrana. Normalmente el potencial de reposo tiene un valor de –60 a –70 mV. La llegada de un estímulo a una neurona provoca una perturbación local de la membrana que tiende a hacer menos negativo dicho potencial. Si éste alcanza el valor umbral de –40 mV, se abren canales de Na^+ dependientes de voltaje (pág. 209) en las proximidades del punto estimulado. Se produce un flujo de Na^+ hacia el interior de la célula, impulsado por el gradiente electroquímico. El ingreso de cationes invierte el signo del potencial de membrana, fenómeno llamado *despolarización*. Cuando se llega a +50 mV, se detiene el pasaje de Na^+ pues se alcanza el equilibrio para este ion. Por otra parte, los canales de Na^+ se cierran espontáneamente después de alrededor de 1 milisegundo y permanecen clausurados por unos milisegundos más, lapso durante el cual son insensibles a estímulos. Retornan a su condición inicial, es decir, cerrados pero excitables, cuando el potencial de membrana vuelve a su valor de reposo.

En el máximo de despolarización (+50 mV) se abren canales de K^+ que permiten el escape de este catión desde la neurona y, por ende, el descenso del potencial hasta alcanzar el valor de equilibrio para el K^+ (–75 mV). El accionar de la Na^+,K^+-ATPasa restablece la distribución de iones y el potencial vuelve a –60 mV.

Como la despolarización en un punto activa canales de Na^+ próximos, la variación eléctrica se propaga rápidamente por el cilindroeje; es el llamado *potencial de acción*, que llega hasta el terminal axónico. Gracias al período de cierre espontáneo de los canales de Na^+, que los torna refractarios, el potencial de acción no retrocede ni determina despolarización permanente de la membrana.

El terminal axónico encierra gran cantidad de vesículas llenas del neurotransmisor correspondiente a la neurona en cuestión. La membrana plasmática a nivel del terminal posee canales de Ca^{2+} sensibles a cambios de voltaje. Cuando el potencial de acción llega al terminal, la despolarización que provoca determina la apertura de canales de Ca^{2+} y el ingreso de este catión desde el espacio extracelular a favor del enorme gradiente electroquímico. El brusco aumento de la concentración de Ca^{2+} activa la fusión de la membrana de las vesículas con la membrana plasmática; se produce liberación del neurotransmisor, por exocitosis, hacia la hendidura sináptica. El neurotransmisor difunde a través del espacio sináptico y va a unirse a receptores específicos en la membrana de la célula postsináptica. Se forma un complejo transmisor-receptor, que genera un nuevo estímulo en la célula alcanzada (otra neurona, miocito, célula glandular). Con frecuencia, la unión del intermediario químico a su receptor promueve la apertura de canales iónicos (*efecto ionotrópico*) y puede causar: a) Ingreso de Na^+ y despolarización de la membrana, con lo cual se genera un nuevo potencial de acción en la célula postsináptica. Se habla en estos casos de *potencial postsináptico excitatorio*. b) Activación de canales de aniones (Cl^-) o de K^+. La apertura de canales de Cl^- produce ingreso de estos aniones en la célula; la de canales de K^+, escape del catión hacia el espacio extracelular. En ambos casos el potencial de membrana se hace más negativo (*hiperpolarización*) e interfiere el impulso nervioso (*potencial postsináptico inhibitorio*).

La formación del complejo transmisor-receptor es seguida otras veces por respuestas que promueven cambios químicos a través de sistemas de señales; el efecto es *metabotrópico*.

RESUMEN

Hígado. *Metabolismo de carbohidratos*: la glucosa es convertida en G-6-P por la glucoquinasa, cuya actividad es significativa cuando los niveles de glucosa se elevan por encima de los valores basales. La glucogenogénesis, glucogenólisis, glucólisis, vía de las pentosas y gluconeogénesis tienen gran actividad en hígado. *Metabolismo de lípidos*: la β-oxidación y biosíntesis de ácidos grasos funcionan activamente. Los ácidos grasos son la principal fuente de energía. El hígado sintetiza triacilgliceroles, fosfolípidos y colesterol. Forma cuerpos cetónicos pero no puede utilizarlos pues carece de tioforasa. *Metabolismo de aminoácidos*: activa síntesis de proteínas. El hígado es rico en aminotransferasas y glutamato deshidrogenasa. Intensa actividad gluconeogénica. Ciclo glucosa-alanina (músculo-hígado). El hígado es el órgano de formación de la urea. *Biotransformación*: las sustancias extrañas o xenobióticos son "desintoxicadas" o, mejor, biotransformadas en el hígado. Las principales reacciones del metabolismo de sustancias extrañas son catalizadas por sistemas enzimáticos asociados al retículo endoplásmico (fracción microsomal). Comprenden: a) Oxidaciones o fase I: sistema oxidante de función mixta o sistema microsomal oxidante. Requiere NADPH y O_2; participan FAD y citocromo P_{450}. b) Conjugaciones o fase II: UDP-glucuronil transferasa, sulfoquinasa (PAPS), transacetilasas (acetil-CoA), conjugación con glicina. c) Reducción. d) Hidrólisis. e) Excreción o fase III. *Metabolismo del etanol:* la mayor parte del etanol ingerido se absorbe en duodeno y yeyuno. Menos del 10% es eliminado sin cambio por orina, aire espirado y sudor; el resto es oxidado en hígado. En una primera etapa el etanol se oxida a acetaldehído; la reacción puede realizarse por tres vías: alcohol deshidrogenasa, sistema microsomal oxidante y catalasa. En personas normales, la alcohol deshidrogenasa, ligada a NAD, es responsable de la oxidación de más del 90% del etanol absorbido. El sistema microsomal oxidante utiliza NADPH, citocromo P_{450} (o CYP2E1), es inducible y no específico; oxida otros compuestos además de etanol. En alcoholistas este sistema puede dar cuenta de más del 30% del total metabolizado. La catalasa normalmente tiene poca importancia en el metabolismo del etanol. En una segunda etapa, el acetaldehído, producto tóxico, es oxidado a acetilo por acetaldehído deshidrogenasa, dependiente de NAD. El acetato formado es unido a CoA y puede seguir las vías de acetato activo, entre ellas oxidación final a CO_2 y H_2O en el ciclo del ácido cítrico. El consumo exagerado de etanol produce exceso de equivalentes de reducción. Hay hiperlactacidemia, reducción de la actividad del ciclo de Krebs, acumulación de ácidos grasos, aumento de la lipogénesis, sobrecarga de los sistemas lanzadera y producción de hígado graso.

Músculo esquelético. *Trabajo aerobio*: cuando el ejercicio es de menor intensidad, el aporte de O_2 puede ser suficiente para generar, por fosforilación oxidativa, el ATP necesario para el trabajo. La tasa máxima de captación de oxígeno (Vo_{2max}) es la cantidad máxima de O_2 que la sangre libera y los músculos pueden utilizar por minuto. La generación de energía por mol de O_2 es 11% mayor cuando se oxidan hidratos de carbono que cuando se consumen ácidos grasos. Por esta razón, si la intensidad del ejercicio aeróbico es cercana a la Vo_{2max} se usa preferentemente glucosa y se consume glucógeno muscular; si el consumo de O_2 es del 60% o menos de la Vo_{2max}, se utilizarán preferentemente ácidos grasos. El *ciclo glucosa-alanina* funciona entre músculo e hígado. El músculo utiliza como combustible α-cetoácidos derivados de aminoácidos de cadena ramificada.

Músculo cardíaco. El corazón posee actividad continua, que se cumple gracias a energía generada aeróbicamente. En reposo o ejercicio moderado, el combustible principal del miocardio son los ácidos grasos. También oxida glucosa, cuerpos cetónicos y lactato. El consumo de glucosa en aerobiosis exige el funcionamiento de conmutadores de H. El más activo en miocardio es la lanzadera malato-aspartato.

Tejido adiposo. Los triacilgliceroles (TAG) del tejido adiposo son la mayor reserva energética del organismo. Las dos principales vías que sigue la G-6-P en el adipocito son la glucólisis y la vía de las pentosas. Los ácidos grasos provistos por la sangre y los sintetizados en el adipocito son utilizados para la síntesis de TAG. Las células adiposas no fosforilan glicerol; utilizan glicerol-3-P obtenido a partir de dihidroxiacetona fosfato de la vía glucolítica. La vida media de los TAG almacenados es de unos 5 días. La lipólisis es catalizada por una lipasa activada por AMPc.

Tejido nervioso. El sistema nervioso central (SNC) consume 20% del total de O_2 utilizado por todo el organismo en reposo. El SNC sólo emplea glucosa como combustible. En condiciones de ayuno prolongado, el cerebro desarrolla capacidad para oxidar cuerpos cetónicos. El SNC depende del suministro de O_2 y glucosa por vía sanguínea. Del total de ATP generado por el SN, aproximadamente 2/3 son empleados en mantener el potencial de membrana; el resto se utiliza en síntesis, principalmente de neurotransmisores. *Impulso nervioso*: en reposo, el interior de la neurona es electronegativo con respecto al exterior. Ante una estimulación, se produce apertura de los canales de Na^+ y K^+. La membrana se despolariza y el cambio se propaga hasta el extremo del axón como potencial de acción. En el terminal, el potencial de acción produce apertura de canales de Ca^{2+} y aumento del nivel del ion en el interior. El Ca^{2+} estimula la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática y la liberación del neurotransmisor en el espacio sináptico.

BIBLIOGRAFÍA

Bollen M., Keppens S., Stalmans W. (1998). Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochemical Journal*, 336: 19-31.

Depré C., Rider M.H., Hue L. (1998). Mechanism of control of heart glycolysis. *European Journal of Biochemistry*, 258: 277-290.

Egan B., Zierath J.R. (2013). Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metabolism*, 17: 162-184.

Horowitz J.F. (2002). Fatty acid mobilization from adipose tissue during exercise. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 14: 386-392.

Lieber C.S. (1997). Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clinica Chimica Acta*, 257: 59-84.

Lieber C.S. (2004). CYP2E1: from ASH to NASH. *Hepatology Research*, 28: 1-11.

Lopaschuk G.D., Ussher J.R., Folmes C.D.L.,Jaswal J.S., Stanley N.C. (2010). Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiological Reviews*, 90: 207-258.

Nagy L.E. (2004). Molecular aspects of alcohol metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 24: 55-78.

Zakim D., Boyer T.D. (2002). *Hepatology*, 4ta. Ed., W.S.Saunders Co., Filadelfia.

CAPÍTULO 21

La información genética (I). Replicación y transcripción

El patrimonio genético o *genoma* de cada individuo está contenido en las moléculas de ADN de sus cromosomas y mitocondrias (y cloroplastos en vegetales). En ellas se encuentran las unidades de información llamadas *genes*.

Los *genes* son porciones de ADN que dirigen la síntesis de las distintas especies de ARN ribosomal (ARNr), de transferencia (ARNt), mensajero (ARNm) y otros tipos de ARN existentes en las células.

En cada división celular, el capital genético de la célula madre pasa, sin modificaciones, a las células hijas; ello exige la duplicación o *replicación* del ADN original.

Para expresarse, la información que el ADN contiene debe ser transferida a moléculas de ARN por un proceso denominado *transcripción*.

La secuencia de bases de una de las clases de ARN, el mensajero, indica el orden en el cual deben ensamblarse los aminoácidos de las proteínas características de cada ser. La síntesis de cadenas polipeptídicas requiere la *traducción* del mensaje cifrado en el ARNm.

Este capítulo y el siguiente presentan los mecanismos de replicación, transcripción y traducción. Estos procesos, especialmente en eucariotas, requieren multitud de factores y muestran una complejidad que va en aumento a medida que se acumulan nuevos conocimientos. Las descripciones que se ofrecen a continuación mencionan sólo los factores más importantes y brindan una versión simplificada de su funcionamiento, eludiendo detalles que complican su comprensión.

REPLICACIÓN DE ADN

Todas las células somáticas de un organismo, originadas por divisiones sucesivas de una única célula primigenia (huevo), poseen igual cantidad de ADN, con la misma estructura primaria (secuencia de nucleótidos). Esto revela una notable propiedad de los seres vivos: la capacidad de transmitir, sin modificación alguna de una generación celular a otra, la información contenida en el ADN nuclear.

La replicación de ADN es semiconservadora

Cada una de las cadenas de ADN de la célula madre sirve de molde o guía para la síntesis de una nueva hebra polinucleotídica complementaria; de esta manera se forman dos dobles hélices idénticas a la original. Este proceso se conoce con el nombre de *replicación* o duplicación del ADN.

En el ADN que recibe cada célula hija, una hebra es nueva y la otra procede de la progenitora. Por eso se dice que la duplicación es *semiconservadora* (fig. 21-1). La replicación de ADN tiene lugar antes de la mitosis, durante un período limitado del ciclo celular llamado *fase S*.

Ciclo celular

Las células eucariotas tienen un ciclo que comprende cuatro etapas. Las primeras tres (G_1, S y G_2) están incluidas en la *interfase*. La mayor parte del tiempo las células se encuentran en interfase, realizando sus tareas metabólicas habituales. La cuarta fase, llamada *M* (mitosis), es la más breve. En ésta se produce la división celular, en la cual se separan las cromátidas y se forman dos células hijas, que inician un nuevo ciclo.

La primera fase, o G_1, corresponde al período de preparación para la replicación del ADN; durante este período se sintetizan los nucleótidos

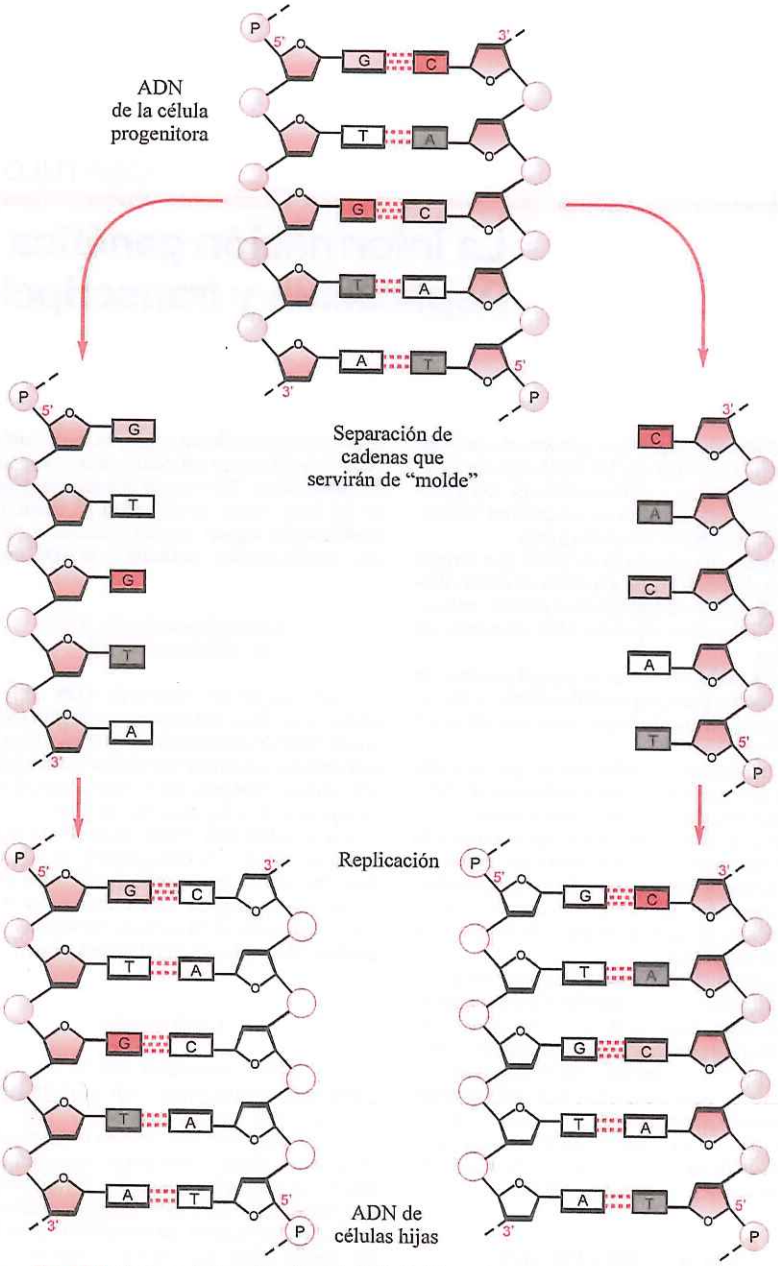


Fig. 21-1. Esquema de la replicación del ADN. En blanco, las cadenas sintetizadas *de novo*.

precursores y todas las enzimas y factores requeridos. En la segunda, o *fase S*, se produce la replicación del ADN. Los nucleosomas se disocian a medida que avanza la síntesis y aumenta notablemente la producción de histonas y otras proteínas estrechamente relacionadas con el ADN. La cantidad de ADN e histonas se duplica en esta fase. La tercera, llamada G_2, es de preparación para la mitosis; se sintetiza tubulina, que forma las microfibrillas del huso mitótico. Finalmente, en la fase *M* se produce la división.

Células humanas en cultivo tienen un ciclo de unas 24 horas, de las cuales corresponden ~9 h a G_1, ~7 h a S, ~6 h a G_2 y 1 a 2 h a M. *In vivo*, la duración del ciclo varía notablemente de un tipo celular a otro. Las fases G_1 y G_2 son muy breves en células con gran actividad mitótica. En cambio, otras células pueden permanecer mucho tiempo sin multiplicarse; por ejemplo, las células hepáticas se dividen una vez cada uno o dos años.

El ciclo celular es regulado por un complejo de proteínas, *ciclinas* y *quinasas dependientes de ciclinas*, activadas por agentes externos (factores de crecimiento) que se unen a receptores específicos en la membrana plasmática y transmiten señales al interior de la célula (ver págs. 517 y 565).

Después de la mitosis, las células ingresan a la fase G_1 para continuar un nuevo ciclo. Si no llegan señales activadoras, se mantienen en un estado no proliferativo, denominado G_0, en el cual se cumplen todas las funciones metabólicas, pero la célula no se divide. Alteraciones en el proceso de regulación del ciclo celular pueden incrementar la actividad mitótica y generar tumores malignos.

Múltiples enzimas y factores intervienen en el proceso de replicación

La replicación es un proceso exquisitamente regulado de manera de asegurar que todo el ADN de cada célula sea duplicado sólo una vez por ciclo celular, durante la fase S. En esta regulación están implicados, entre otros factores, ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas. Si bien el mecanismo básico es similar en eucariotas y procariotas, es más complejo en los primeros.

El paso inicial de la replicación es la separación de las dos cadenas. Esto es indispensable para que cada una de ellas actúe como guía en el ensamble de una nueva hebra complementaria.

La replicación comienza en un punto fijo, el *sitio de origen* o *iniciación*, en el cual secuencias específicas de bases sirven de señales de reconocimiento para el complejo de enzimas y factores que inicia la replicación. En muchos casos, el sitio de origen contiene secuencias ricas en pares A-T, más fáciles de separar que los apareamientos G-C. El primer paso es la formación del complejo de reconocimiento del origen (ORC), compuesto por seis subunidades. Luego se agrega el complejo de mantenimiento del minicromosoma (MCM), también formado por seis subunidades.

Los cromosomas de procariotas, el ADN mitocondrial y los ADN virales circulares tienen un solo sitio de origen. En cambio, las enormes moléculas lineales de los cromosomas de eucariotas empiezan a replicarse en múltiples sitios; en humanos existen de 30 a 50 mil sitios de iniciación. La separación se inicia simultáneamente en todos los cromosomas y en muchos puntos de la molécula de ADN de cada uno de ellos. Como resultado, se producen en la doble hélice "bubones" o "burbujas" en las zonas de separación. Las burbujas o unidades de replicación reciben el nombre de *replicones*. En el núcleo de cada célula humana pueden formarse alrededor de cincuenta mil "burbujas de replicación". De este modo el desenrollamiento se completa con mayor rapidez que si se efectuara progresivamente de un extremo a otro de la larguísima doble hélice de cada cromosoma.

El sitio en el cual las dos cadenas se separan es denominado "*horquilla de replicación*"; en cada burbuja o zona de separación se producen dos horquillas que avanzan en sentidos opuestos, alejándose del punto de origen (fig. 21-2).

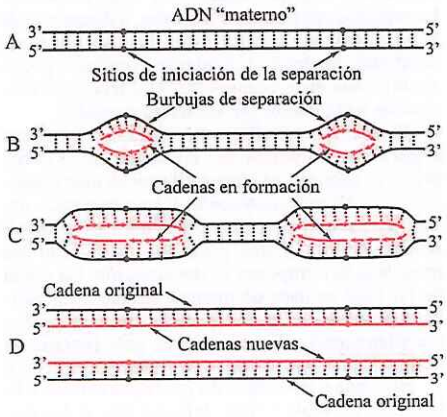


Fig. 21-2. Esquema de la replicación de ADN a partir de dos sitios de iniciación. **A.** Molécula original (doble hélice). **B.** Se inicia la separación y replicación simultánea de ambas hélices de ADN. **C.** El mismo proceso en una fase más avanzada. **D.** Se ha completado la replicación y se han formado dos dobles hélices de ADN iguales a la original.

Helicasa. La enzima desenrollante o *helicasa*, cataliza la separación de las cadenas de ADN. Para ello se requiere energía, provista por la hidrólisis de ATP.

Topoisomerasas. En el ADN circular de bacterias, la separación de las dos cadenas desde un punto produce superenrollamientos en otras regiones de la doble hélice. En moléculas lineales cortas, la separación no crea tensiones; éstas se alivian fácilmente por rotación de los extremos libres. En cambio, las moléculas lineales de cromosomas de eucariotas, por su enorme longitud y por las múltiples interacciones en los agrupamientos de nucleosomas, carecen de libertad para rotar; por ello se producen torsiones por delante de las horquillas de separación. Tanto en bacterias como en eucariotas, el problema se resuelve efectuando cortes transitorios de la cadena en las zonas hipertorsionadas. Estos cortes son catalizados por *topoisomerasas*, de las cuales se conocen dos tipos, I y II. La enzima tipo I corta una de las hebras de la doble hélice y alivia la tensión por rotación libre de la cadena seccionada sobre la otra. No se requiere energía, pues el pasaje del estado superenrollado al relajado tiene un ΔG negativo. La enzima tipo II, llamada también *girasa*, secciona las dos hebras del ADN. Es dependiente de ATP. Ambas enzimas tienen capacidad para unir los cabos de las cadenas cortadas y restablecer la continuidad de la doble hélice una vez alcanzado el estado relajado.

La girasa de bacterias es inhibida por antibióticos como el *ácido nalidíxico* y otras sustancias. La topoisomerasa II de eucariotas, a diferencia de la homóloga de bacterias, no es afectada por ácido nalidíxico, razón por la cual este compuesto puede ser utilizado en el tratamiento de infecciones producidas en humanos por bacterias sensibles.

Proteínas específicas mantienen las hebras separadas. A medida que las hebras de la doble hélice se separan, se unen a ellas *proteínas fijadoras de ADN monocatenario*; las de bacterias son designadas con las siglas SSB, del inglés *single strand binding*. Estas proteínas estabilizan las monohebras e impiden su reasociación. La unión de las SSB se hace de manera tal que no perturba el proceso de "copia" para formar una cadena complementaria. En eucariotas, esta función es realizada por la *proteína A de replicación* (RPA).

Helicasa y proteínas de fijación avanzan a lo largo de la doble hélice dejando tras sí las dos cadenas separadas, listas para servir de molde en la síntesis de nuevas hebras complementarias. La síntesis se inicia simultáneamente en todos los sitios de desenrollamiento, antes que la doble hélice original termine de separarse totalmente (fig. 21-2).

ADN polimerasas. La formación de la nueva cadena se hace por ensamble de desoxirribonucleótidos catalizado por enzimas llamadas *ADN polimerasas*. En bacterias se han aislado tres, designadas con números romanos (I, II, III). En eucariotas hay más, son identificadas con letras griegas; las más importantes son las $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ y ε.

Las ADN polimerasas difieren entre sí en sus propiedades y funciones; sin embargo, todas ellas comparten las siguientes características:

a) Sus sustratos son los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato dATP, dGTP, dCTP y dTTP. Estas moléculas no sólo proveen la "materia prima" para la síntesis, sino también la energía requerida.

b) Necesitan una cadena separada de ADN que le sirva de guía o molde. Sólo funcionan sobre una hebra de ADN e insertan, uno a uno, los nucleótidos complementarios a los de la cadena patrón.

c) Son incapaces de unir nucleótidos libres e iniciar una nueva hebra. Sólo pueden elongar una hebra preexistente, llamada iniciadora o *"cebador"* (en inglés *primer*), correctamente apareada por puentes hidrógeno con la hebra molde.

d) Todas las ADN polimerasas catalizan la unión de desoxirribonucleótidos para formar cadenas desde el extremo 5' hacia el 3'. Esto implica establecer uniones diéster desde el hidroxilo del carbono 3' de la desoxirribosa del nucleótido terminal de la cadena iniciadora, al fosfato del carbono 5' del nucleótido que ingresa. Por lo tanto, debido al antiparalelismo de las hélices, las polimerasas recorren la cadena guía en sentido 3' $\rightarrow$5', contrario al de síntesis de la nueva hebra.

Las ADN polimerasas son complejos moleculares formados por asociación de diversas subunidades.

Replisoma. El conjunto de todas las proteínas comprometidas en la duplicación del ADN es un complejo multienzimático que funciona como verdadera "máquina de replicación", a la cual se la llama *replisoma*.

Mecanismo de la replicación

Como las ADN polimerasas necesitan una cadena preexistente, el proceso comienza con la formación de un trozo de ARN de unos diez nucleótidos de extensión, al cual se lo denomina *ARN iniciador*, *"cebador"* o *primer*. Esta síntesis es catalizada por una ARN polimerasa denominada *primasa*, firmemente asociada a la ADN polimerasa α en eucariotas. La primasa agrega ribonucleósidos trifosfato en sentido 5'$\rightarrow$3' para formar un segmento complementario del ADN molde de unos diez nucleótidos de longi-

tud. Frente a guanina inserta citosina y viceversa; frente a timina, introduce adenina y frente a adenina, uracilo (fig. 21-3).

A continuación del ARN iniciador, por acción de ADN polimerasa α, se agregan alrededor de 20 desoxirribonucleótidos. Cuando se ha formado un trozo de hebra de unos 30 nucleótidos (incluidos los 10 del *primer* de ARN) el complejo polimerasa α-primasa se desprende y la elongación de la cadena es continuada por la polimerasa δ, que sigue incorporando sucesivamente los nucleótidos necesarios para formar una cadena complementaria de la hebra de ADN original. En la reacción de incorporación de cada nucleótido se libera pirofosfato (PP_i). El proceso total de síntesis puede indicarse por la ecuación:

$$n\,dATP + n\,dGTP + n\,dTTP + n\,dCTP \xrightarrow[\text{ARN iniciador, cadena molde}]{\text{ADN polimerasa, } Mg^{2+}} \text{Polímero } 4n\ \text{dRibonucleótidos} + 4n\ PP_i$$

El proceso es irreversible; el pirofosfato es hidrolizado de inmediato por pirofosfatasa, en una reacción altamente exergónica:

$$PP_i + H_2O \xrightarrow{\text{Pirofosfatasa}} 2\,P_i$$

Las dos cadenas de ADN original son replicadas simultáneamente, aunque en sentido opuesto. Las dos hebras de una molécula de ADN son antiparalelas, marchan en direcciones contrarias, y la ADN polimerasa realiza la síntesis sólo desde el extremo 5' al 3' de la cadena en formación, la cual será a su vez complementaria y antiparalela de la hebra guía. Esto implica que la ADN polimerasa recorre la cadena molde, en el sentido 3'→5' uniendo desoxirribonucleótidos complementarios a los de ésta (figs. 21-3 y 21-4). Las polimerasas más eficientes alcanzan a insertar unos 1.000 nucleótidos por segundo.

A partir del sitio inicial de separación de las dos cadenas, una de las hebras tendrá la dirección 3'→5', apropiada para su "lectura" directa por la ADN polimerasa. Sobre esta cadena, la síntesis de la nueva hebra complementaria prosigue sin interrupción después de la formación del iniciador ARN-ADN (figs. 21-2 y 21-3); a esta hebra se la llama *líder*, *conductora* o *adelantada*. La otra cadena no puede ser ensamblada en forma continua, pues la dirección de la hebra molde es contraria a la del progreso de la ADN polimerasa. Por esta razón, la síntesis se realiza en segmentos, cuando se ha separado una porción suficientemente extensa de la cadena patrón (fig. 21-4). La síntesis de estos trozos requiere, como para la hebra líder, la formación previa de ARN iniciador o cebador de unas 10 unidades nucleotídicas, catalizada por la primasa. Al extremo 3' de este ARN se unen desoxirribonucleótidos, según el principio de complementariedad con la cadena patrón; primero unos 20 nucleótidos insertados por la polimerasa α y luego la polimerasa δ continúa hasta completar un segmento de alrededor de 200 nucleótidos de extensión (en procariotas son más largos, 1.000 bases o más) designados fragmentos de Okazaki. Su longitud es equivalente a la del ADN comprendido en un nucleosoma, razón por la cual se cree que un nucleosoma por vez libera su ADN para la replicación. La cadena que se forma en trozos recibe el nombre de *retardada* o *rezagada*. Se ha propuesto que la hebra patrón de esta cadena rezagada, que progresa en sentido contrario al de lectura de la polimerasa, debe formar un "bucle" para presentarse al replisoma en la dirección adecuada (fig. 21-4). Los trozos de ARN iniciador de cada fragmento de Okazaki son rápidamente eliminados; se sintetiza ADN para cubrir la brecha y los extremos 3' y 5' que quedan libres son unidos para obtener una cadena continua.

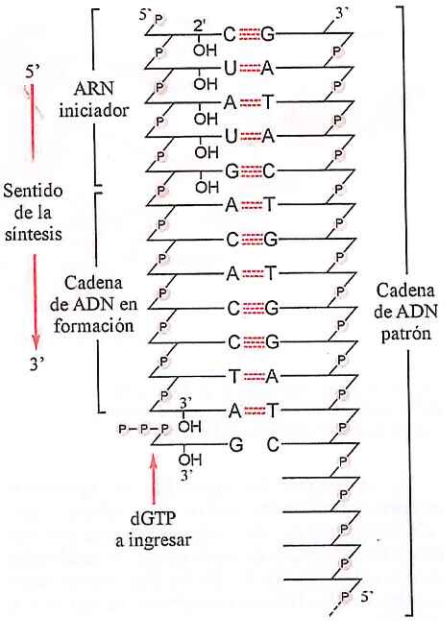


Fig. 21-3. Representación esquemática del proceso de replicación de ADN. A continuación del ARN iniciador se van insertando los desoxirribonucleótidos de la nueva cadena de ADN, complementaria de la hebra patrón o guía.

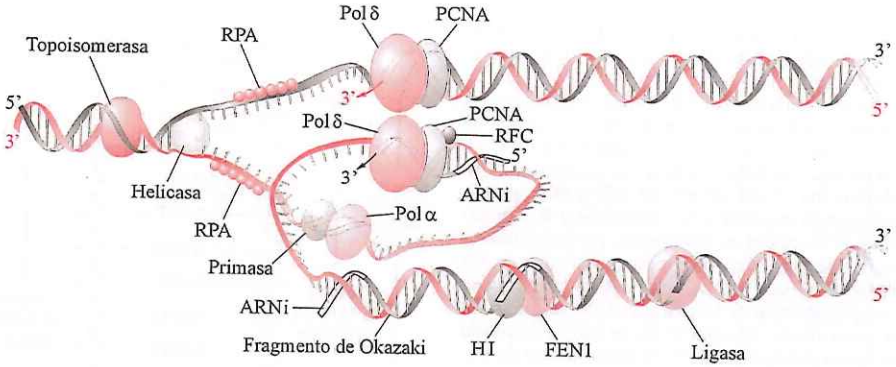


Fig. 21-4. Representación esquemática del proceso de replicación de ADN. RPA: proteína A de replicación. Pol α: ADN polimerasa α. RFC: factor C de replicación. PCNA: antígeno nuclear de células proliferantes. Pol δ: ADN polimerasa δ. ARN_i: ARN iniciador o *primer*.

En su avance, dos horquillas de replicación iniciadas en distintos puntos de la misma molécula se aproximan una a otra y terminan por reunirse; las "burbujas de replicación" se confunden en una sola (figs. 21-3 y 21-4). Finalmente resultan dos dobles hélices completas, idénticas a la original.

El proceso se realiza en las siguientes etapas:

a) Durante la fase G_1 del ciclo celular se realiza el reconocimiento de la secuencia de iniciación en la hebra guía del ADN y la formación de un complejo multiproteico en cada uno de los sitios donde debe comenzar la síntesis. El ensamble del complejo se realiza ordenadamente. Primero se une la proteína iniciadora ORC (de *origin recognition complex)*, la que agrega otras proteínas que fijan sobre la doble hebra a la *helicasa*, enzima encargada de catalizar el desenrollamiento de las hebras del ADN. La helicasa es inactiva durante la fase G_1 y es estimulada al ingresar en la fase S del ciclo por acción de dos proteína quinasas, una de ellas ciclina quinasa. Esta etapa es regulada de tal modo que la replicación ocurre sólo una vez en cada ciclo.

A medida que se separan las hebras se fijan a cada una proteínas de unión a hebras simples (SSB, del inglés *single strand binding*), que en eucariotas se llaman *proteínas A de replicación* (RPA), e impiden que las hebras se vuelvan a asociar para reformar la doble hélice.

b) La activación del complejo promueve la unión de otras proteínas, entre ellas la primasa y las polimerasas α, δ y ε. Todas estas proteínas forman la maquinaria de replicación (*replisoma*).

La primasa cataliza la síntesis del *primer* o iniciador de ARN, de unos 10 ribonucleótidos de longitud apareados (complementarios) con los de la hebra guía. La polimerasa α, asociada a la primasa, agrega alrededor de 20 desoxirribonucleótidos. De inmediato una proteína llamada *factor de replicación C* (RFC) se une al extremo 3' de este segmento ARN-ADN iniciador y desplaza a la polimerasa α y la primasa. El RFC funciona como una ATPasa dependiente de ADN. Su principal papel es cargar la proteína *antígeno nuclear de células proliferantes* (siglas del inglés, PCNA) sobre el ADN en formación.

c) PCNA es un complejo anular que rodea al ADN y promueve la puesta en funciones de la polimerasa δ. Fija la polimerasa δ a la hebra guía y asegura su acción ininterrumpida; el conjunto polimerasa δ-PCNA se desliza sobre la cadena molde en el sentido de la síntesis. La capacidad de la polimerasa para funcionar en forma continuada a lo largo de gran número de nucleótidos es llamada *procesividad*. La polimerasa δ es altamente "procesiva", mientras la α lo es en mucho menor escala.

El mecanismo descripto es idéntico para la hebra líder y para la rezagada. En la primera, la polimerasa δ completa la síntesis desde un único cebador de ARN hasta el final de la porción de hebra que le sirve de molde; en la hebra rezagada, el complejo polimerasa δ-PCNA debe desprenderse al terminar cada fragmento de Okazaki y reinsertarse de nuevo para elongar el próximo después que el complejo polimerasa α-primasa ha ensamblado el iniciador ARN-ADN del trozo siguiente.

d) Al tiempo que sintetiza la nueva hebra de ADN, la polimerasa δ detecta eventuales errores en el apareamiento de bases. Su actividad exonu-

cleasa 3'→5', le permite corregirlos (ver sección siguiente).

e) De inmediato se procede a la degradación de la porción de ARN iniciador Esta función la cumplen *ribonucleasas* que catalizan la hidrólisis de las uniones fosfodiéster 3'-5'. La brecha producida por la eliminación del ARN es cubierta por ADN sintetizado por polimerasa δ (o por polimerasa ε).

f) Finalmente se establecen enlaces fosfodiéster entre el hidroxilo del extremo 3' y el fosfato 5' de los segmentos vecinos sintetizados en forma discontinua. Esta acción está a cargo de *ADN ligasa*, requiere energía, y ocurre cuando el apareamiento entre las bases de la cadena neoformada y el molde es correcto.

En definitiva, todas las moléculas de ADN de la célula progenitora se duplican. Cada una tiene una de las hebras del ADN original y otra complementaria sintetizada *de novo*.

Funciones de las otras ADN polimerasas. La *ADN polimerasa* γ interviene en la replicación del ADN circular de mitocondrias. La *ADN polimerasa β* participa en procesos de reparación de ADN; la función de la polimerasa ε sería similar a la de pol δ; también participaría en reparación de ADN.

En la tabla 21-1 se presentan algunas de las enzimas y factores comprometidos en el proceso de replicación en células eucariotas.

Reparación de ADN

La secuencia de bases del ADN debe ser duplicada con toda fidelidad. Una sola base insertada incorrectamente puede causar mutaciones severas, o incluso ser letal. Teniendo en cuenta la extrema complejidad del proceso de replicación, es sorprendente su precisión. En condiciones normales, la información genética almacenada en el ADN nuclear se transmite inalterada a través de las sucesivas divisiones celulares. Además de la eficiencia de la replicación sobre un molde, esta perfección es debida a la existencia de sistemas de corrección o reparación de eventuales errores cometidos durante la síntesis.

El primer agente de control de calidad es la ADN polimerasa δ; mientras inserta nucleótidos complementarios sobre la hebra guía, realiza una tarea de detección de errores (se ha comparado esta función con la corrección de pruebas de imprenta, en inglés, *proof-reading*). Las polimerasas δ, γ y ε tienen actividad exonucleasa 3'→5', que les permite eliminar la última base incorporada si no está adecuadamente apareada.

A pesar de esta capacidad de autocorrección de la polimerasa, el número de bases es tan grande que algunos errores son inevitables. En eucariotas se produce uno cada 10^9 o más bases incorporadas.

Tabla 21-1. Enzimas y factores comprometidos en la replicación de ADN en eucariotas.

Proteína	*Función*
Helicasa (proteína desenrollante)	Separa las dos hélices por ruptura de los puentes de hidrógeno que mantienen apareadas las bases.
Topoisomerasas I y II	Producen cortes en las cadenas de doble hélice por delante de la horquilla de replicación, para aliviar las tensiones creadas por el desenrollamiento.
Proteína A de replicación (RPA)	Se fija a las hebras separadas del ADN original e impide su reasociación.
Primasa (asociada a Polimerasa α)	Cataliza la síntesis de ARN iniciador o "primer", de unos 10 nucleótidos.
ADN polimerasa α	Cataliza la síntesis de un trozo de ADN de unos 20 nucleótidos a continuación del ARN iniciador.
Factor C de replicación (RFC)	Desplaza el complejo polimerasa α–primasa. Fija PCNA.
Antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA)	Estructura en anillo que fija la polimerasa δ y asegura la síntesis ininterrumpida.
ADN polimerasa δ	Cataliza la síntesis de ADN a continuación del iniciador producido por polimerasa α-primasa. Tiene actividad exonucleasa 3'→5'.
ARNasa HI Nucleasa FEN1	Eliminan los trozos de ARN iniciador.
ADN ligasa	Une, mediante enlaces fosfodiéster 3'→5', los segmentos del ADN neoformado.
ADN polimerasa ε	Síntesis y reparación de ADN. Tiene actividad exonucleasa 3'→5'.
ADN polimerasa γ	Sintetiza ADN mitocondrial circular. Tiene actividad exonucleasa 3'→5'.
ADN polimerasa β	Actúa en sistemas de reparación de ADN.

Por otra parte, el ADN de las células está expuesto a agentes químicos y físicos que pueden alterar su estructura. Por ejemplo, la luz ultravioleta determina formación de enlaces covalentes entre restos timina contiguos; la estructura secundaria del ADN se perturba y se bloquea la replicación.

La reparación de errores o daños en el ADN comprende diferentes mecanismos: a) reparación de errores de apareamiento, b) reparación por escisión de base, c) reparación por escisión de nucleótidos y d) reparación de ruptura de las dos cadenas del ADN.

Cada uno de estos procesos requiere la presencia de muchas proteínas reunidas en diferentes complejos que cumplen las acciones de reparación: a) separación de la base o segmento de cadena mal apareado o defectuoso, a cargo de endo- y exonucleasas; b) incorporación de la o las bases correctas siguiendo el principio de complementariedad con la cadena molde normal; para ello se requiere la intervención de polimerasas; c) unión del trozo a reponer con los extremos cortados de la hebra de ADN en reparación, catalizada por ligasa.

La ruptura de las dos cadenas del ADN puede ser causada por distintos agentes, principalmente especies reactivas de oxígeno y radiaciones ionizantes. Hay varios mecanismos para la reparación del corte de ambas hebras de ADN. Uno de ellos comprende el intercambio de regiones equivalentes de la doble hélice de cromosomas homólogos. Este proceso, llamado *recombinación*, ocurre también en las células germinales durante la meiosis. Se utiliza la información existente en el cromosoma homólogo sano para dirigir la reposición del sitio dañado en la otra doble hélice. Aquí también se requiere la participación de un complejo multiproteico.

En enfermedades como la *anemia de Fanconi*, *ataxia telangiectásica*, enfermedad degenerativa del sistema motor debida a incapacidad de reparar daños oxidativos en el cerebelo, y *xerodermia pigmentosum*, caracterizado por hipersensibilidad a la luz ultravioleta y aparición de áreas pigmentadas en la piel, existen fallas en la reparación de ADN. Las personas con esta clase de alteraciones tienen alta incidencia de neoplasias y envejecimiento prematuro. Un tipo frecuente de cáncer colorrectal hereditario se debe a defectos genéticos en uno de los sistemas de reparación de ADN.

Redistribución de genes en las gametas. En óvulos y espermatozoides, durante la meiosis se produce recombinación del ADN de cromosomas homólogos, con intercambio de segmentos entre las dos dobles hélices. Esto resulta en una redistribución de los genes contenidos en los trozos intercambiados. No describiremos el mecanismo de la recombinación; sólo señalaremos que el proceso, similar al de uno de los mecanismos de reparación, requiere energía, provista por la hidrólisis de ATP, y un conjunto de proteínas, entre ellas la llamada Rad51.

La recombinación contribuye a aumentar la variabilidad genética en organismos con reproducción sexuada.

Telomerasas

La replicación de ADN lineal como el de los cromosomas eucariotas plantea un problema. Cuando se ha completado el proceso de duplicación, frente a los extremos 3' de las hebras molde queda un trozo de ARN iniciador. Estos segmentos son eliminados por ARNasa, pero no pueden ser reemplazados por ADN, pues las ADN polimerasas no funcionan sin primer. El cabo 3' de cada cadena guía no podría ser duplicado. Los cromosomas se harían progresivamente más cortos en sucesivas divisiones celulares, con pérdida irreparable de información genética. Este problema es demorado por la existencia, en los extremos de los cromosomas (telómeros), de trozos de ADN que no contienen información, pero éstos también se van acortando.

En humanos, ese ADN telomérico "descartable" está constituido por cientos de repeticiones de una secuencia corta de bases (TTAGGG). En células con gran actividad mitótica, se insertan segmentos adicionales al extremo 3' del ADN telomérico preexistente, acción catalizada por enzimas de naturaleza ribonucleoproteica llamadas *telomerasas*, que contienen en su estructura un trozo de ARN utilizado como molde para ensamblar las porciones con las cuales se elonga la cadena de ADN (la síntesis de una cadena de ADN sobre una plantilla de ARN es similar a la realizada por la transcriptasa inversa; ver pág. 426). Sobre la cadena neoformada, una ADN polimerasa sintetiza la hebra complementaria para formar el ADN telomérico de doble hélice.

Las telomerasas compensan el acortamiento producido por las sucesivas divisiones. En células somáticas que se dividen con escasa frecuencia, no se detecta actividad de telomerasa o ésta es muy pobre. Se supone que la vida de estas células está limitada por la longitud de los telómeros de las células originales. Estos se acortan en cada replicación hasta agotar la reserva de ADN telomérico (senescencia celular); cuando esto sucede, la célula no puede seguir reproduciéndose y sobreviene la muerte. Células cancerosas con alta actividad telomerasa son inmortales; continúan

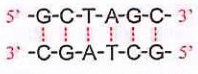
su reproducción indefinidamente porque los extremos del ADN son repuestos en cada división.

Endonucleasas de restricción

También llamadas *enzimas de restricción* o *restrictasas*, fueron descubiertas en diferentes especies de bacterias. Catalizan la hidrólisis de uniones fosfodiéster entre desoxirribonucleótidos en sitios específicos de la doble hélice. Su función en la célula bacteriana es protegerla de la invasión de ADN extraño. El ADN de la propia bacteria es metilado en las bases en los lugares de corte de la endonucleasa; se enmascaran así los posibles sitios de ataque y se previene la autodestrucción de su material genético.

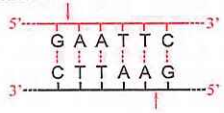
Se han aislado y purificado varios miles de restrictasas diferentes. En general, se las denomina con las primeras letras del nombre del organismo del cual se obtienen. *Eco* designa a las endonucleasas procedentes de *Escherichia coli*; *Hin* de *Haemophilus influenzae*; *Hae*, de *Haemophilus aegyptius*; *Alu*, de *Arthrobacter luteus*, etc. A veces se agrega una cuarta letra (indica la cepa) y un número romano.

Las endonucleasas reconocen específicamente secuencias definidas. Muchos de los sitios de ataque son iguales para diferentes enzimas, razón por la cual es menor el número de estos sitios (varios cientos) que el de enzimas conocidas. La secuencia reconocida es un trozo de 4 pares de bases de longitud para algunas enzimas y hasta de 7 en otras; frecuentemente el segmento de cada hebra es autocomplementario si se lo rota 180°. En otros términos, los segmentos de las dos hebras tienen la misma secuencia (en sentido 5' →3'). Por ejemplo:

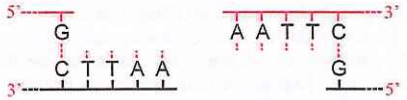


Fragmentos de este tipo son llamados *palindrómicos*.

El siguiente esquema muestra los sitios específicos de acción de la enzima de restricción *Eco*RI, aislada de *E. coli*. Las flechas señalan los puntos de corte.



Los enlaces diéster atacados no están en el mismo nivel de ambas cadenas. En consecuencia, los extremos resultantes del corte presentan un segmento terminal de una sola hebra de cuatro nucleótidos de extensión:



El extremo 5' de una de las hebras seccionada tiene un resto fosfato y el 3' de la otra, un grupo hidroxilo. Estos cabos son denominados "adhesivos" porque tienden a aparearse a los extremos complementarios originados por la misma enzima en otras moléculas de ADN. En la figura 21-5 se dan ejemplos de secuencias reconocidas por distintas endonucleasas. Algunas enzimas cortan la doble cadena en sitios precisamente opuestos en ambas hebras y no generan extremos adhesivos.

Las enzimas de restricción se utilizan para cortar moléculas de ADN en lugares definidos. La endonucleasa secciona a la molécula de ADN

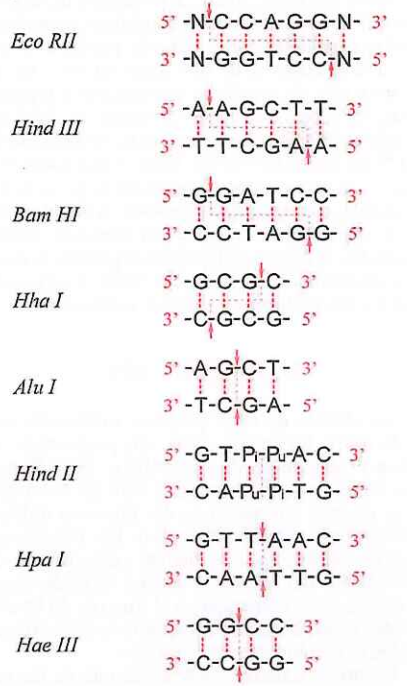


Fig. 21-5. Secuencias reconocidas por enzimas de restricción. Las cuatro primeras producen un corte "escalonado" que genera extremos adhesivos; las cuatro últimas seccionan transversalmente la doble hélice sin dejar segmentos terminales de una sola hebra.

en todos los sitios donde se encuentre la secuencia que le sirve de sustrato específico, generando varios segmentos. Si el sitio de reconocimiento de la restrictasa es de una longitud de 6 bp, es posible que se encuentre esa secuencia repetida cada 4096 bp; si el lugar de ataque es de 4 bp, puede estimarse que seccionará la doble hebra de ADN en trozos de 256 bp. Estos fragmentos, tratados con otra enzima de restricción, se escinden en trozos más pequeños si poseen en algún sector de la doble hélice la secuencia correspondiente. Mediante el uso de restrictasas es posible realizar una disección controlada del ADN. Estas enzimas tienen múltiples y valiosas aplicaciones.

TRANSCRIPCIÓN

La síntesis de ARN presenta similitudes con la de ADN. En ambos casos, una polimerasa cataliza el ensamble de nucleótidos para formar una hebra complementaria de otra de ADN que sirve de guía o molde. Los dos procesos utilizan nucleósidos trifosforados, con las diferencias lógicas exigidas por la distinta composición en nucleótidos del ARN. La cadena formada copia la información contenida en el trozo de ADN utilizado como plantilla, razón por la cual el proceso recibe el nombre de *transcripción*.

Como se sintetiza ARN sobre una de las cadenas de ADN, se dice que la transcripción es asimétrica. La hebra molde de ADN sobre la cual se ensambla el ARN complementario es llamada *"antisentido"* o *"no codificante"*. La otra cadena, no transcripta, tiene la misma secuencia que el ARN sintetizado (admitiendo el cambio de T por U); es la hebra *"con sentido"* o *"codificante"*.

Todos los ARN se generan en el núcleo; una vez completada la síntesis, las moléculas de ARN se dirigen al sitio en el cual cumplirán su función.

La unión de los nucleótidos es catalizada por *ARN polimerasas dependientes de ADN*, así llamadas pues funcionan únicamente en presencia de un molde de ADN.

Transcripción en procariotas

En bacterias, la ARN polimerasa es un complejo oligomérico integrado por subunidades diferentes. Una de esas subunidades contiene el sitio catalítico responsable de la formación de enlaces fosfodiéster 5'→3', mientras otra se encarga de fijar la holoenzima a la cadena de ADN molde. Una subunidad denominada sigma (σ) reconoce el lugar preciso donde debe iniciarse la transcripción. Los diferentes monómeros cumplen distintas funciones; todos ellos deben estar presentes para que la holoenzima comience su actividad sintetizante.

Los sitios del ADN reconocidos por la subunidad σ son segmentos de secuencia definida llamados *promotores*. Están ubicados a cierta distancia del lugar donde debe comenzar la transcripción.

Cuando se desea indicar la posición de un sitio dado de la hebra codificante de ADN, se dice que está "corriente arriba" si se ubica hacia el extremo 5', o "corriente abajo", si se encuentra hacia el extremo 3' con respecto a un lugar determinado de la cadena. La localización exacta es precisada por el número de nucleótidos existentes entre el sitio y el punto de referencia, precedido por un signo – o +, según se halle "corriente arriba" o "corriente abajo" respectivamente.

En bacterias, el promotor presenta dos módulos ubicados 10 y 35 bases hacia el extremo 5' ("corriente arriba") del segmento a transcribir. En estos sitios se encuentran secuencias específicas denominadas "cajas" (en inglés *boxes*). El módulo en posición –10 tiene una secuencia rica en adenina y timina (TATAAT), llamada *caja de Pribnow*. El otro, en –35, tiene la secuencia TTGACA. Existen pequeñas diferencias en la secuencia de estas cajas cuando se estudian distintas especies.

Segmentos como los señalados se denominan *secuencias consenso* y corresponden a ordenamientos de bases en los cuales cada posición se indica con el resto nucleotídico que se encuentra con mayor frecuencia cuando se comparan muchas secuencias con igual función en diversas células y organismos.

La ARN polimerasa se une al ADN y provoca su desenrollamiento; la enzima toma como patrón sólo una de las hebras del ADN. La separación de las dos cadenas abarca un trecho de 17 pares de bases, es decir, algo más de una vuelta y media de la doble hélice. La misma ARN polimerasa actúa inicialmente como *"desenrollasa"* y también restablece la doble hélice después de la transcripción.

En presencia de todos los ribonucleósidos trifosforados (ATP, GTP, CTP y UTP) la enzima comienza la polimerización insertando un nucleótido con base púrica (ATP o GTP) como primera unidad de la cadena. Este nucleótido conserva sus tres fosfatos, lo cual sirve como señal del extremo inicial. A diferencia de la ADN polimerasa, la ARN polimerasa no requiere un segmento iniciador, *primer* o "cebador". La unión de nucleótidos se hace con la secuencia dictada por la hebra de ADN guía; para formar apareamientos estables, frente a timina se inserta adenina; frente

a guanina, citosina; frente a adenina, uracilo, y frente a citosina, guanina. La unión de cada nucleótido libera pirofosfato, el cual es desdoblado por pirofosfatasa.

$$n\,ATP + n\,CTP + n\,GTP + n\,UTP \xrightarrow[Mg^{2+}\ ADN\ molde]{ARN\ polimerasa} ARN + 4n\,PP_i$$

La polimerización progresa en la dirección 5'→3' de la hebra neoformada, en sentido antiparalelo al de la cadena guía.

Cuando se han unido unos diez nucleótidos, la subunidad σ se desprende. Una vez que la polimerasa ha avanzado lo suficiente como para dejar libre el segmento de fijación inicial, puede unirse a éste otra holoenzima. Por tal razón, sobre una cadena molde es posible el ensamble simultáneo de varias moléculas de ARN utilizando la misma información. Cada una de ellas tiene, en un momento dado, distinta longitud según la distancia recorrida por la ARN polimerasa sobre la hebra guía.

El final de la síntesis de una cadena es indicada por una secuencia específica en el ADN, que actúa como señal de terminación. Poco antes del sitio final de la transcripción existen sectores ricos en GC repetidas; la cadena sintetizada tiene en este segmento trozos autocomplementarios y puede volverse sobre sí misma para formar una horquilla cerca de su terminación. La horquilla retrasa o detiene el avance de la ARN polimerasa. Además, se han aislado proteínas que promueven la liberación de la cadena de ARN recién sintetizada; una de esas proteínas es llamada rho (ρ). La existencia de señales de iniciación y terminación al comienzo y al final de un gen o conjunto de genes es importante, pues asegura la copia completa de las unidades de información. De lo contrario, la transcripción podría comenzar en medio de un gen y terminar en cualquier parte.

Transcripción en eucariotas

En eucariotas, el proceso de transcripción es similar al descripto para procariotas, aunque algo más complejo. Las células de organismos superiores poseen en el núcleo al menos tres polimerasas (I, II y III) cada una encargada de la síntesis de diferentes clases de ARN. La ARN polimerasa I (pol I) se localiza en el nucléolo; cataliza la síntesis de los tres tipos más grandes de ARN ribosomal (28S, 18S y 5,8S). La ARN polimerasa II (pol II) se encuentra en el nucleoplasma (contenido nuclear aparte del nucléolo); es responsable de la síntesis del ARN precursor del ARN mensajero y otros tipos de ARN, como los llamados pequeños o cortos, y los largos, no codificantes. La ARN polimerasa III (pol III), también en el núcleo, es encargada de la síntesis de los ARN de transferencia, de ARN ribosomal 5S y de otros ARN de molécula pequeña (snRNA y scRNA). Existe una cuarta ARN polimerasa en mitocondrias, similar a la bacteriana, que transcribe el ADN de esas organelas. Todas estas enzimas están formadas por 12 o más subunidades cada una. Igual que las ADN polimerasas, las que sintetizan ARN ensamblan cadenas polinucleotídicas en el sentido 5'→3', desplazándose en dirección 3'→5' sobre el molde formado por una de las hebras de ADN.

Las ARN polimerasas, a diferencia de las que catalizan la replicación del ADN, no tienen capacidad para corregir errores producidos en el apareamiento de bases. De allí que la transcripción, si bien tiene un alto grado de exactitud, no alcanza la extraordinaria fidelidad del proceso de duplicación de ADN.

Las tres enzimas pueden diferenciarse por su sensibilidad a la α *amanitina*, toxina del hongo *Amanita phalloides*. La ARN polimerasa I es insensible al veneno; la II es inhibida por muy bajas concentraciones de α amanitina, mientras la III sólo es afectada por altas concentraciones de la toxina.

Factores de transcripción. La ARN polimerasa de bacterias inicia la transcripción sin necesidad de proteínas adicionales; en cambio, las de eucariotas requieren el auxilio de proteínas llamadas *factores basales o generales de transcripción*, que se unen al ADN y a la polimerasa, ubican a ésta en la posición correcta en el promotor, colaboran en la separación de las dos hebras de la doble hélice y promueven la iniciación de la transcripción.

Los factores de transcripción basales cumplen un papel semejante al de la subunidad σ de procariotas pero, a diferencia de ésta, no forman parte de la ARN polimerasa. Son designados con las iniciales TF (del inglés, *transcription factor*) seguidas de los números romanos I, II o III, según la polimerasa con la cual actúen, y otra letra.

Cada polimerasa interactúa con proteínas diferentes que colaboran en el reconocimiento de los promotores, pero hay un factor común presente en el complejo de iniciación de las tres polimerasas; es la proteína de unión a la caja TATA, designada con las siglas TBP (del inglés, *TATA binding protein*).

Transcripción y "empaquetamiento" del ADN. Es otro aspecto diferencial de la transcripción en eucariotas. Si bien el ADN que es transcripto se encuentra más desplegado (eucromatina) que el inactivo o heterocromatina, el superenrollamiento en los nucleosomas puede entorpecer la

iniciación de la transcripción cuando el sitio promotor queda cubierto. En este caso, las histonas son desplazadas de su posición para dejar libres las zonas promotoras y permitir el acceso del complejo de transcripción. Una vez iniciada la síntesis de la cadena de ARN, ésta continúa sin tropiezos; la presencia de nucleosomas no bloquea la elongación.

La metilación de bases del ADN y la acetilación de las histonas influyen notablemente sobre la estructura de la cromatina y la actividad de los cromosomas. El ADN altamente metilado se encuentra en mayor proporción en los genes inactivos. En cambio, cuando las histonas se acetilan, la cromatina se "relaja", se hace más laxa, lo que favorece la transcripción.

Síntesis de ARN precursor del mensajero

Es catalizada por la ARN polimerasa II. En eucariotas, se sintetiza una molécula de *ARN precursor*, generalmente más largo que el *ARNm final* o "*maduro*", cuya molécula es utilizada como guía durante la síntesis de proteínas.

Promotor. Comprende tres sitios o módulos. Uno de ellos está en posición –25 con respecto al lugar de iniciación; es la *caja TATA* o *caja de Hogness-Goldberg*, secuencia consenso heptanucleotídica formada por restos timina y adenina (equivalente a la *caja de Pribnow* de bacterias). En su mayoría las cajas TATA están flanqueadas por secuencias ricas en GC. Otros módulos componentes del promotor suelen encontrarse aproximadamente en –40 y –110; son las *cajas CAAT* y *GC*. Dichas secuencias en el promotor son llamadas *elementos genéticos de acción cis* porque están en la misma molécula de ADN que se transcribe. A estos sitios se unen factores de transcripción, proteínas que interactúan con la polimerasa y entre sí, esenciales para que la síntesis comience en el lugar correcto, lo que explica su localización a una distancia fija del sitio de inciación. Cambios de una sola base en el promotor pueden afectar notablemente la actividad de síntesis.

Activadores y represores. La transcripción en eucariotas es también influida por proteínas regulatorias (activadores y represores) que se unen a secuencias específicas del ADN situadas a veces a miles de pares de bases del promotor. Estas secuencias pueden estar situadas "corriente arriba", "corriente abajo" o aun dentro del trozo de ADN transcripto. Para un mismo gen pueden existir varias secuencias regulatorias.

Las zonas de ADN sobre las cuales se ejercen acciones activadoras son llamadas *potenciadoras* o aumentadoras (en inglés *enhancers*).

Es llamativo que activadores o represores de la transcripción actúen uniéndose al ADN en sitios distantes del promotor. La explicación más simple de este fenómeno propone que la molécula de ADN se dobla en asa para permitir la aproximación de esas zonas alejadas de la doble hélice y ubica a la proteína activadora, fijada al *enhancer*, junto al complejo de iniciación en el promotor.

Otros factores de transcripción. Además de los factores generales de transcripción mencionados se han identificado numerosas proteínas que se unen con gran afinidad a secuencias específicas en promotores, a regiones regulatorias "corriente arriba" (URE, de *upstream regulatory element*) y a potenciadores o *enhancers*. El control de la maquinaria transcripcional de la ARN polimerasa II es mediado por una red de factores de transcripción, muchos de los cuales son activados por hormonas. En general, los sectores a los cuales se fijan los factores de transcripción son designados *elementos de respuesta*. En los capítulos 22 y 24 se volverá sobre este tema.

Formación del complejo. En primer lugar se une el factor de transcripción IID (TFIID) a la caja TATA. El TFIID está compuesto por múltiples subunidades, una de las cuales es la *proteína de unión a la caja TATA* (TBP); las restantes son polipéptidos llamados *factores asociados a TBP* que se identifican con las siglas TAF (del nombre inglés *TBP associated factor*) (fig. 21-6).

A continuación se agregan otros factores (TFIIA, TFIIB, TFIIF, TFIIE, TFIIH) y la pol II, que, junto al mediador (ver más adelante), forman el *complejo de iniciación de la transcripción*. TFIIH tiene actividad de helicasa y proteína quinasa; esta última cataliza la fosforilación de la polimerasa II en múltiples sitios.

La pol II fosforilada se desprende del complejo y comienza la transcripción desplazándose sobre la hebra guía de ADN. Los factores de transcripción se disocian, se separan del promotor y quedan disponibles para comenzar una nueva ronda con otra pol II.

Formación del *cap*. En eucariotas, el extremo 5' de la cadena de ARN en formación es rápidamente modificado por unión de una molécula de GTP mediante un enlace 5'-5' (nótese que no es el enlace 3'-5' común en las cadenas polinucleotídicas); de inmediato, el nitrógeno 7 de la guanina es metilado. De esta manera, el terminal 5' de la cadena es 7-metilguanosina trifosfato, especie de "casquete" o capuchón de la molécula (*cap* en inglés). Este casquete distintivo sirve para el reconocimiento del extremo 5' del ARNm por el complejo que inicia la traducción; además da estabilidad al ARNm, protegiéndolo de la acción de fosfatasas y exonucleasas.

Inserción de la "cola" de poli A. Otra de las transformaciones del ARN después de la transcripción es la adición, en el extremo 3' de la cadena, de un trozo de 100 a 200 nucleótidos de adenina ("cola" de poli A). Esta adición se produce en la mayoría de los ARNm de eucariotas; sólo muy pocos, entre ellos los ARNm para histonas, no se poliadenilan.

La señal para la inserción del poli A es una secuencia AAUAAA que se encuentra entre 11 a 30 bases antes del extremo final. Algunas cadenas presentan más de una señal de este tipo y, por lo tanto, más de un sitio donde puede ocurrir la poliadenilación. Una endonucleasa específica secciona la cadena de ARN en el lugar señalado y entonces, a partir del extremo 3' del corte, una *poli A polimerasa* que no requiere molde sintetiza un segmento adicional de 100 a 200 nucleótidos de adenina, con ATP como donante de las unidades constituyentes. El segmento terminal 3' o "cola" de poli A contribuye a la eficiencia de la traducción y da estabilidad al ARN.

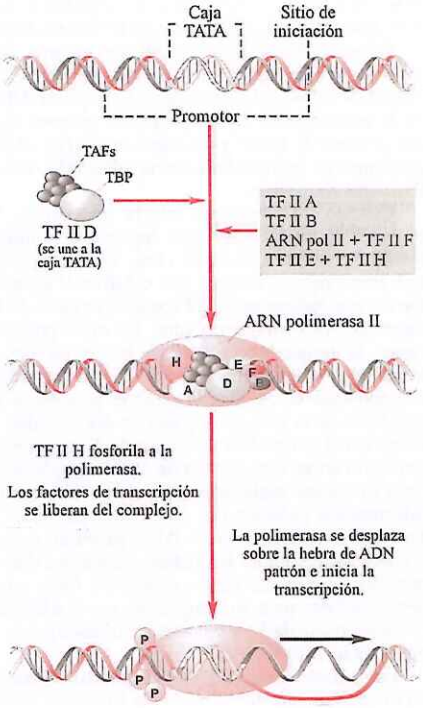


Fig. 21-6. Ensamble del complejo de iniciación de la transcripción (representación muy esquemática). Sobre la doble hélice de ADN, en la caja TATA del sitio promotor, se une primero el factor TFIID; luego se van fijando los restantes factores, aproximadamente en el orden indicado. El complejo ubica a la polimerasa en la posición correcta. A medida que la enzima avanza sobre el ADN se produce separación de las hélices en un tramo algo más largo que una vuelta y media.

Los ARN sintetizados por la pol II son liberados en el nucleoplasma donde forman parte del llamado ARN nuclear heterogéneo (ARNnh), que incluye también a los ARNm "maduros". Estos se forman por procesamiento del ARN original que se realiza después de la transcripción. El proceso, designado con el vocablo inglés *splicing*, comprende eliminación de trozos internos de la molécula y empalme de los extremos seccionados. En el capítulo siguiente se darán más detalles sobre este tema.

Mediador. Es un complejo formado por múltiples subunidades cuya función es la regulación de la iniciación y elongación de la transcripción, de la expresión de transcriptos de la polimerasa II, es decir, la mayoría de los genes que codifican proteínas y ARN no codificantes y del procesamiento del ARN mensajero.

Síntesis de ARN de transferencia

La ARN polimerasa III tiene a su cargo la transcripción de los genes que codifican para ARNt.

Promotor. Los genes de ARNt tienen dos promotores (cajas A y B) situados "corriente abajo" del sitio de iniciación, dentro de la zona correspondiente a los propios genes.

Formación del complejo. Uno de los factores de transcripción, el TFIIIC, se une a las secuencias promotoras A y B. Actúa como factor de ensamble que permite ubicar correctamente a otro factor, el TFIIIB, 50 pares de bases "corriente arriba" de la caja A. TFIIIB contiene la subunidad TBP; favorece la unión y posicionamiento de la pol III para iniciar la transcripción.

Procesamiento del ARNt precursor. En primera instancia se sintetiza un ARN precursor que debe ser procesado en el núcleo antes de pasar al citoplasma. Las modificaciones postranscripción comprenden metilación de varias de las bases constituyentes, remoción de segmentos de la cadena, unión de los fragmentos para formar la molécula final y adición de la secuencia CCA característica del extremo 3' terminal de todos los ARNt. El agregado de las tres unidades se efectúa de a una por vez, catalizado por *nucleotidil transferasa*. El ARN de transferencia no tiene capuchón o *cap* de 7-metilguanosina trifosfato ni "cola" de poli A. El extremo 5' de los ARNt se genera por acción de *ribonucleasa P*, una ribozima (pág. 446).

Los genes de ARNr 5S y algunos de los ARN pequeños son transcriptos por ARN polimerasa III.

Síntesis de ARN ribosomal

Los ribosomas de organismos eucariotas están formados por dos partículas; la mayor (de 60S) constituida por tres moléculas de ARN (de 5S, 5,8S y 28S) y unas 45 proteínas diferentes, y la menor (de 40S) compuesta por una molécula de ARN (de 18S) y alrededor de 30 proteínas (pág. 128).

Existen miles de copias de los genes que codifican para los tres ARNr de mayor tamaño, agrupadas en el nucléolo, en conjuntos repetidos en tándem. Los genes de la fracción 5S están localizados en otra zona del ADN nuclear.

Promotores. Los promotores de los genes de ARNr en el nucléolo se extienden unos 50 pares de bases, que comienzan en la posición –100. A este sitio se lo llama *elemento de control "corriente arriba"* (UCE, de *upstream control element*).

Formación del complejo. Dos factores se unen a las secuencias promotoras, el *factor de unión "corriente arriba"* (UBF, de *upstream binding factor*) y el *factor 1 de selectividad* (SL1), que contiene la subunidad TBP. A estos factores se fijan la pol I y otras proteínas que forman el complejo de iniciación.

Procesamiento del ARNr precursor. Por acción de la ARN polimerasa I se sintetiza una larga cadena de 45S que comprende las tres moléculas mayores de ARN (28S, 18S y 5,8S). Este material precursor sufre cortes para generar los ARNr "maduros". El procesamiento comprende también metilaciones en el hidroxilo del C2' de las ribosas. En estas metilaciones intervienen partículas de ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNA).

Transcripción de ARNr de 5S. Los genes de ARNr de 5S son transcriptos por la pol III. En humanos existen unas 2.000 copias de este gen dispuestas en tándem. Los promotores tienen una región de control (caja C) ubicada "corriente abajo" del sitio de comienzo de la transcripción (de +81 a +99) y otra (caja A) de +50 a +65. Después que el factor TFIIIA se une a la caja C se forma un complejo con TFIIIC y TFIIIB. Este último contiene una subunidad TBP. La pol III se fija al complejo y se inicia la transcripción.

Una vez liberadas las moléculas de ARNr, se asocian con las proteínas correspondientes. La porción de 18S, unida a proteínas, forma la partícula ribosomal pequeña. El ARN de 5S, transcripto por ARN polimerasa III de genes extranucleolares, se une a los ARN de 28S y 5,8S, sintetizados por pol I en el nucléolo, y a un conjunto de proteínas para formar la partícula mayor. Existe estricta coordinación de la síntesis de los diferentes componentes de los ribosomas para asegurar la producción de cantidades equimoleculares de cada uno de ellos.

ADN polimerasa transcriptasa inversa

Como se ha descripto en secciones anteriores, el ADN sirve de molde para su replicación por ADN polimerasa y para la síntesis de ARN durante la transcripción catalizada por ARN polimerasas ADN dependientes. Esto llevó a proponer que la transferencia de información se efectuaba sólo desde el ADN hacia el ARN. Sin embargo, hallazgos posteriores demostraron la existencia de un proceso de *transcripción invertida*, que sintetiza ADN sobre un molde de ARN.

En virus ARN se descubrió una enzima, designada *transcriptasa inversa*, que cumple funciones de *ADN polimerasa dependiente de ARN*. Se la encuentra en virus agentes de tumores (ej.: del sarcoma de Rous) y otras patologías (ej.: el del síndrome de inmunodeficiencia adquirida, sida), llamados *retrovirus*.

Cuando un retrovirus infecta una célula, la obliga a sintetizar ADN que reproduce la información genética del ARN viral. El virus posee una transcriptasa inversa que cataliza el ensamble de una cadena de ADN complementaria de la hebra de ARN invasor. Como las otras polimerasas, la transcriptasa inversa incorpora desoxinucleótidos en dirección 5'→3'. La actividad ribonucleasa de la misma enzima promueve la hidrólisis de la cadena original de ARN molde y libera la hebra de ADN neoformada. Esta sirve de guía para armar otra cadena de ADN complementario y obtener finalmente una doble hélice con la información genética del ARN viral (fig. 21-7). Esta doble hélice, llamada ADN proviral, posee secuencias idénticas en ambos extremos, denominados *terminales largos repetidos*; éstos contienen señales para su integración en el ADN de la célula hospedadora y posterior transcripción a un ARN idéntico al viral.

La *azidotimidina* (AZT), compuesto utilizado en el tratamiento del sida, es un inhibidor de la transcriptasa inversa.

Inicialmente se pensó que la transcripción invertida era patrimonio exclusivo de los retrovirus. Sin embargo, el proceso es más extendido y se lo considera responsable de la inserción de segmentos comúnmente hallados en el genoma de bacterias y células de eucariotas. Las telomerasas, por ejemplo, tienen actividad transcriptasa inversa.

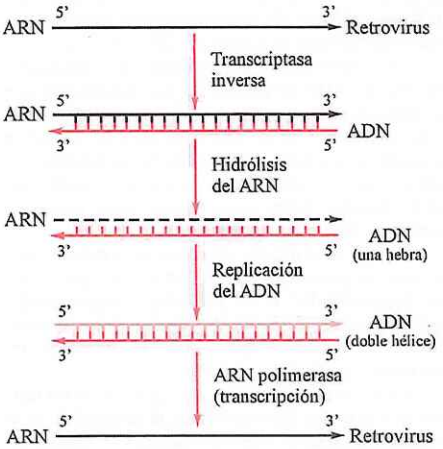


Fig. 21-7. Esquema muy simplificado de las acciones de la transcriptasa inversa. Una hebra de ARN es la "plantilla" para la síntesis de una cadena complementaria de ADN. Posteriormente el ARN es hidrolizado y el ADN sirve de guía en el ensamble de otra cadena (replicación). Se forma una doble hélice que se incorpora al genoma de la célula hospedadora. Dicho ADN es transcripto para reproducir el ARN viral.

MÉTODOS UTILIZADOS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

No es propósito de este texto la descripción de metodologías. Sin embargo, como el asombroso desarrollo de técnicas de biología molecular y su impacto en la manipulación del material genético han causado una verdadera revolución en biología, bioquímica y medicina, consideramos conveniente referir brevemente procedimientos actualmente muy utilizados.

Determinación de secuencia de bases. Es posible determinar con precisión la secuencia de bases en una muestra de ADN. El método más difundido fue el ideado por Sanger. Otra técnica fue la propuesta por Maxam y Gilbert. En la actualidad estos métodos han sido reemplazados por tecnologías llamadas de próxima generación. Se han desarrollado equipos automáticos y refinamientos metodológicos que reducen enormemente el tiempo requerido y el costo de la secuenciación. La continua superación de los métodos ha posibilitado el asombroso avance de los estudios genómicos.

Síntesis de polinucleótidos. Con métodos químicos se ha logrado preparar cadenas de gran número de nucleótidos de extensión. Se dispone de instrumentos programables que sintetizan automáticamente oligonucleótidos de secuencia definida.

Sondas de ADN. Una sonda (en inglés *probe*) es una cadena de ADN cuya secuencia es complementaria de segmentos de un gen o de cualquier porción del genoma. Se aparean específicamente (hibridan) con trozos de hebra simple de ADN o ARN y sirven para identificar, aislar o amplificar una determinada región de ADN.

Las sondas pueden sintetizarse químicamente o por técnicas de biología molecular: copia de una cadena de ARN mediante transcriptasa inversa, o separación de un fragmento de ADN genómico cortado por una enzima de restricción. Los trozos usados como sondas son "marcados" por incorporación de un elemento isotópico radiactivo (^{32}P) o un grupo químico identificable por fluorescencia. Esto permite "rastrear" la sonda y detectar el sitio donde ha hibridado.

Electroforesis de ADN

Cuando una muestra de ADN es sometida a la acción de una endonucleasa de restricción, las moléculas existentes en la preparación sufren cortes en los sitios que presentan la secuencia específica reconocida por la enzima. Dichos sitios se distribuyen a lo largo de las moléculas de ADN, de modo que éstas son escindidas en fragmentos. La cantidad y longitud de los segmentos producidos a partir de un ADN determinado varían según la endonucleasa utilizada, ya que cada enzima actúa sobre distintos sitios.

Los trozos obtenidos pueden ser separados por electroforesis. El ADN tiene grupos fosfato con carga negativa; si se establece en el medio un campo eléctrico, ha de desplazarse hacia el ánodo. Como medio soporte se utilizan geles, corrientemente de poliacrilamida y de agarosa (polisacárido de algas marinas). Cuando gelifican, ambos polímeros forman una red porosa que actúa como un tamiz; los segmentos de ADN más cortos pasan con mayor facilidad, mientras los más grandes son retardados. La velocidad de migración de los trozos de ADN en el gel es inversamente proporcional al logaritmo del número de bases que contienen. El método tiene gran poder de resolución; geles de poliacrilamida pueden separar segmentos de ADN que difieren entre sí en sólo un par de bases.

Para visualizar la posición alcanzada en el gel por los distintos fragmentos después de la migración se emplea alguno de los siguientes recursos: a) Tinción con bromuro de etidio (compuesto fluorescente que se fija a ADN de doble hélice); las zonas de migración de los diversos fragmen-

tos de ADN aparecen como bandas de fluorescencia rojo-naranja cuando se ilumina el gel con luz ultravioleta. El bromuro de etidio puede ser carcinogénico, razón por la cual actualmente se prefiere utilizar otro compuesto, el SYBR green, que también se une a ADN y da fluorescencia con luz UV. b) Autorradiografía. Se incorpora un isótopo radiactivo (^{32}P) a los segmentos de ADN antes de la electroforesis. Una vez completada la migración, se coloca sobre el gel una película radiográfica que es expuesta a las radiaciones del isótopo. Se obtiene así una autorradiografía del gel, en la cual aparecen bandas netas, correspondientes a las zonas hasta donde han migrado los segmentos de ADN.

Los patrones de bandas permiten hacer comparaciones entre distintas muestras de ADN tratadas con las mismas restrictasas y demostrar identidad y diferencias determinadas por mutaciones que afectan los sitios de restricción. Las variaciones detectadas entre muestras de ADN de distintos individuos son expresión de heterogeneidad o polimorfismo genético. Se habla de *polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción* (RFLP en las siglas inglesas). Este tipo de análisis puede ser aplicado al diagnóstico de enfermedades genéticas.

ADN RECOMBINANTE

La recombinación artificial de ADN de diferentes organismos ha sido uno de los avances más espectaculares de la biología molecular.

El "mapeo" de cromosomas, es decir, la localización exacta de los genes que los integran; el clonado de genes, esto es, el aislamiento y replicación controlada de un gen determinado; la transmisión de información genética de una especie a otra, la amplificación de segmentos del genoma, etc., son logros alcanzados en este campo. Los métodos básicos utilizados en la recombinación tienen muy extensa aplicación gracias a que el ADN de todos los seres vivientes posee el mismo patrón general de organización.

El descubrimiento de las endonucleasas de restricción y el conocimiento del mecanismo de acción y duplicación de plásmidos y virus han sido factores decisivos en el desarrollo experimental de estas técnicas.

Plásmidos. Las bacterias, organismos procariotas, poseen un cromosoma constituido por una gran molécula de ADN circular, en la cual reside prácticamente toda la información genética necesaria para su funcionamiento normal. Además, muchas bacterias poseen otras moléculas de ADN circular llamadas *plásmidos* (pág. 125). En general, los plásmidos contienen mucho menos información que el cromosoma; éste posee varios miles de genes y el plásmido sólo unos pocos.

Los plásmidos se replican independientemente del ADN cromosomal; la información que contienen se transmite no sólo a las células hijas, sino también a otras bacterias, aun de diferente especie, por pasaje a través de la membrana externa. Suelen existir varios de estos plásmidos en una bacteria; algunos contienen genes que confieren resistencia a antibióticos.

En una muestra de bacterias es posible seleccionar las portadoras del plásmido al cual deben su insensibilidad a un antibiótico determinado, adicionándolo al medio de cultivo. Sólo desarrollarán las bacterias resistentes; las carentes del plásmido no pueden subsistir.

Un plásmido puede ser seccionado en un único sitio por una endonucleasa de restricción si la secuencia específica reconocida por la enzima se presenta sólo una vez en su molécula. Se produce apertura del círculo sin fragmentación del mismo.

La *Escherichia coli*, bacteria saprofita del intestino humano, ha sido una de las más intensamente utilizadas en los estudios de plásmidos y ADN recombinante.

Formación de ADN recombinante. Para la preparación de ADN recombinante pueden utilizarse plásmidos tratados con una endonucleasa de restricción que produce un corte en el ADN circular y formación de dos extremos adhesivos (fig. 21-8).

Con la misma enzima de restricción se trata ADN aislado de un organismo "donante". El ADN es seccionado en todos los sitios en donde exista la secuencia de bases específica de la endonucleasa. Se generan de este modo múltiples fragmentos con extremos adhesivos.

Uno de los métodos emplea para la recombinación todos los fragmentos formados. En otros casos, se utiliza un trozo determinado de ADN obtenido por "clonación" (ver más adelante).

Se mezcla el ADN segmentado con los plásmidos abiertos y, gracias a la adhesión de los extremos complementarios, se produce entonces la inserción del segmento "foráneo" en la abertura producida en el plásmido (fig. 21-8). La unión entre las hebras de ambos ADN se efectúa mediante ADN ligasas.

El nuevo ADN recombinante circular es agregado a un cultivo de *E. coli* en presencia de $CaCl_2$ que permeabiliza la pared bacteriana. Las bacterias captan la nueva información genética, la replican y sintetizan las proteínas codificadas en el trozo de ADN introducido. Se dice que la bacteria se ha *transformado*. En los plásmidos se

pueden insertar segmentos de ADN de tres mil pares de bases (3 kb) en promedio. No sólo los plásmidos sirven de vectores de información genética de un organismo a otro; también se utilizan virus con el mismo propósito.

Si se usa ADN de *bacteriófagos* (pág. 129) como receptor del ADN foráneo, el ADN recombinante puede ser "empaquetado" en la cubierta del fago si se lo mezcla con las proteínas del virus. Estas se ensamblan espontáneamente *in vitro* y generan partículas completas del fago, con capacidad para infectar *E. coli* e introducirle el ADN recombinante. En los fagos se insertan trozos de hasta 23 kb de ADN foráneo. Para segmentos aún mayores se utilizan *cósmidos*, híbridos entre plásmidos y fago lambda (λ) que contienen sólo una pequeña parte del ADN del fago. Con ellos se introducen en la bacteria fragmentos de hasta 40 kb. Porciones genómicas más grandes (de 100 a 1.000 kb) han sido incorporadas en *Sacaromyces cerevisiae*, ensamblando cromosomas artificiales de levadura que se replican en cada ciclo de división.

Además de las endonucleasas de restricción, otra enzima muy utilizada en la producción de ADN recombinante es la *transferasa terminal*. Esta enzima cataliza la adición sucesiva de nucleótidos por uniones fosfodiéster al extremo 3' de las cadenas de ADN. Emplea indistintamente dATP, dGTP, dTTP o dCTP y no requiere molde o guía para el ensamble. Con ella es posible construir extremos adhesivos en trozos de ADN cuyas dos hebras hayan sido cortadas al mismo nivel. Al ADN "donante" se agregan, en los extremos 3' de sus dos hebras, colas formadas por un solo tipo de nucleótido. Por ejemplo, si se suministra sólo dATP como sustrato precursor, la transferasa terminal forma, a continuación de los extremos 3', cadenas constituidas exclusivamente por nucleótidos de adenina (a este tipo de polímero se lo llama poli A). Si el ADN del vector es tratado con transferasa terminal, con dTTP como precursor, se formarán en los extremos 3' sendas colas de poli T (fig. 21-9). "Donante" y "receptor" poseen ahora extremos adhesivos, complementarios, que se aparearán cuando ambos sean mezclados. Finalmente, la unión entre las hebras de los ADN adosados se obtiene por acción de ADN ligasa. Con esta técnica se pueden asociar ácidos desoxirribonucleicos de muy diversa procedencia: por ejemplo, ADN de mamíferos con el de virus, bacterias, o cualquier otro organismo. En células eucariotas, la introducción de material genético foráneo recibe el nombre de *transfección*.

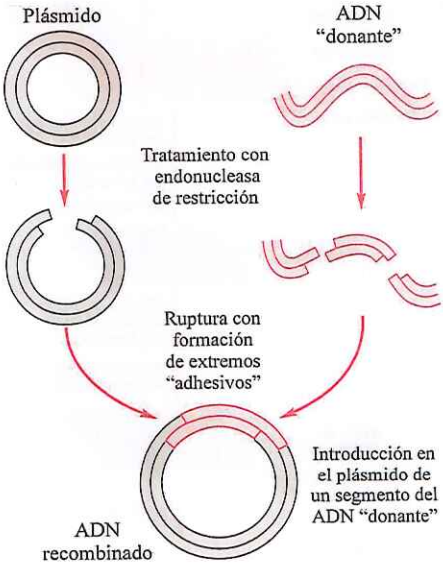


Fig. 21-8. Representación esquemática de la formación de ADN recombinante. Se utiliza un plásmido como receptor del ADN "donante". Ambos son seccionados con una endonucleasa de restricción que produce extremos adhesivos.

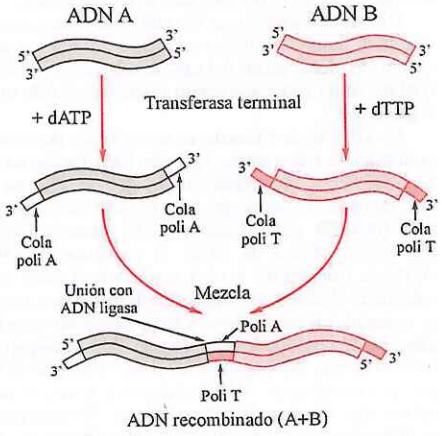


Fig. 21-9. Representación esquemática de la formación de ADN recombinante con segmentos de ADN de diferente origen (**A** y **B**) en los cuales ambas hebras de la doble hélice han sido seccionadas al mismo nivel y posteriormente se han agregado extremos adhesivos utilizando transferasa terminal.

La recombinación de ADN ha tenido efectos multiplicadores en cuanto al desarrollo de una disciplina conocida como *ingeniería genética*. Sin duda, ésta ha sido una de las más activas fronteras de avance de la biología molecular. Los métodos de ADN recombinante tienen numerosas aplicaciones. La transferencia de ADN permite introducir en una célula información genética que le confiere nuevas propiedades. Por ejemplo, se pueden obtener bacterias que sintetizan proteínas de uso terapéutico, o mejorar la capacidad de organismos animales o vegetales para producir alimentos.

Southern blotting

Aun cuando procedan de distintas células u organismos, monohebras de ADN con secuencias complementarias se asocian espontáneamente para constituir una doble hélice cuando se las pone en contacto en un medio de temperatura y concentración salina adecuadas. Lo mismo ocurre entre cadenas de ADN y ARN cuando tienen la complementariedad necesaria para establecer apareamientos estables entre las bases nitrogenadas de ambas hebras.

Este fenómeno de hibridación es utilizado en diversas técnicas para reconocer la presencia de determinado ordenamiento de bases en una muestra de ácido nucleico. A estos fines debe disponerse de un trozo de ADN de secuencia conocida, complementaria con la investigada (sonda o *probe*).

Un procedimiento en el cual se utilizan sondas es el llamado *Southern blotting* (*Southern* es el nombre del creador del método; *blotting* puede traducirse en este caso como transferencia de un lugar a otro).

El ADN de la muestra es seccionado por una endonucleasa de restricción; los fragmentos son separados por electroforesis en gel de agarosa, que después se sumerge en una solución alcalina (NaOH) para desnaturalizar (desenrollar) las dobles hélices de ADN. A continuación, el ADN es transferido a otro medio en el cual es más fácil efectuar las manipulaciones. Para esto se colocan en una cubeta varias capas de papel absorbente empapado en solución salina concentrada. Encima del papel se dispone el bloque del gel que contiene el ADN separado y sobre él se aplica una lámina de nitrocelulosa. Finalmente se colocan varias capas de papel absorbente seco (fig. 21-10). La solución asciende por capilaridad desde el papel absorbente inferior hacia el gel, lo atraviesa y alcanza el filtro de nitrocelulosa y el papel absorbente superior. El ascenso del líquido arrastra el ADN estacionado en el gel, que es retenido por el filtro, en el cual se obtiene una réplica o calco del gel. Se retira la lámina de nitrocelulosa y se la calienta en estufa para fijar el ADN, inmovilizado en las mismas posiciones alcanzadas en el gel al finalizar la migración.

En el filtro se detecta la presencia de ADN de secuencia determinada, utilizando un segmento monohebra complementario marcado con ^{32}P que sirve de sonda. Si se pone en contacto el filtro de nitrocelulosa con una solución de la sonda, ésta hibridará en los sitios donde exista ADN de secuencia complementaria. Se forman dobles hélices adheridas al filtro. El ADN excedente, no hibridado, se elimina por lavado. Sobre el filtro se coloca una película fotográfica sensible (autorradiografía) en la cual aparecerán las bandas correspondientes a

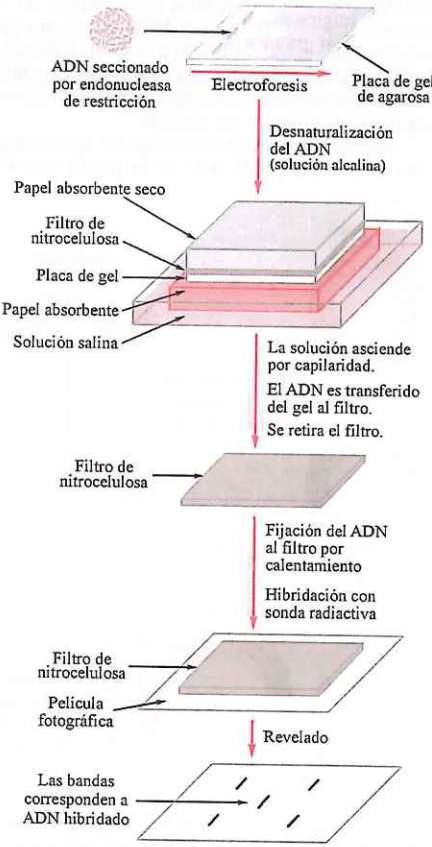


Fig. 21-10. Representación esquemática del método *Southern blotting*.

los segmentos en los cuales se ha producido hibridación con la sonda radiactiva (fig. 21-10).

Se han desarrollado métodos que utilizan el mismo recurso de transferencia desde el gel a una lámina de nitrocelulosa para el estudio de ARN (*Northern blotting*) y proteínas (*Western blotting*).

Amplificación de secuencias de ADN

Reacción en cadena de la polimerasa

A veces interesa analizar un trozo de ADN que representa una porción ínfima dentro de una muestra dada. La escasez de material puede frustrar la investigación; es necesario recurrir a métodos que permitan amplificar la muestra. Uno de ellos es el "clonado" (véase más adelante). Otro, ampliamente utilizado en la actualidad, es una ingeniosa técnica, designada *reacción en cadena de la polimerasa* (PCR en las siglas inglesas), que permite multiplicar a voluntad un segmento dado de ADN en una muestra.

Para aplicar este método es necesario conocer las secuencias que flanquean el tramo de ADN por reproducir y sintetizar oligonucleótidos complementarios con cada una de las hebras del ADN en la proximidad de los extremos del segmento que interesa. Estos oligonucleótidos actuarán como iniciadores, "cebadores" o *primers* (fig. 21-11).

A la muestra de ADN se agrega un exceso de los oligonucleótidos iniciadores o *primers*, y de los cuatro desoxinucleósidos (A, T, G, C) trifosfato, más ADN polimerasa. Esta mezcla se calienta hasta obtener total desnaturalización del ADN; al enfriar, los cebadores se aparean con los sectores complementarios de cada una de las hebras, señalando el sitio de comienzo de la replicación. La ADN polimerasa comienza el ensamble de una nueva cadena a partir del extremo 3' de los iniciadores. Se produce replicación del fragmento de ADN deseado, ya que éste es el único que dispone de primer. Al finalizar esta etapa del proceso, se ha duplicado el segmento de ADN.

Se inicia entonces un segundo ciclo, calentando la mezcla a fin de separar las dobles hélices formadas. Como en el medio existe un exceso de oligonucleótidos iniciadores, los extremos complementarios de las monohebras se aparean con ellos y la polimerasa reanuda la elongación hasta completar las cadenas. Ahora se ha cuadruplicado la cantidad inicial de trozos del ADN seleccionado (fig. 21-11).

El calentamiento necesario para desnaturalizar el ADN inactiva a la gran mayoría de las polimerasas, lo cual obligaría a reponer la enzima después de cada etapa. Para evitar esta complicación, se usa ADN polimerasa aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, resistente a las temperaturas empleadas durante el desenrollamiento del ADN.

Como los oligonucleótidos iniciadores sólo se aparean a los extremos de determinado sector del ADN, es éste el que resulta selectivamente duplicado en cada ciclo y su cantidad en la mezcla va creciendo en progresión geométrica en etapas sucesivas. El proceso se puede repetir cuantas veces sea necesario. Después de unos 25 ciclos se produce una multiplicación de más de un millón

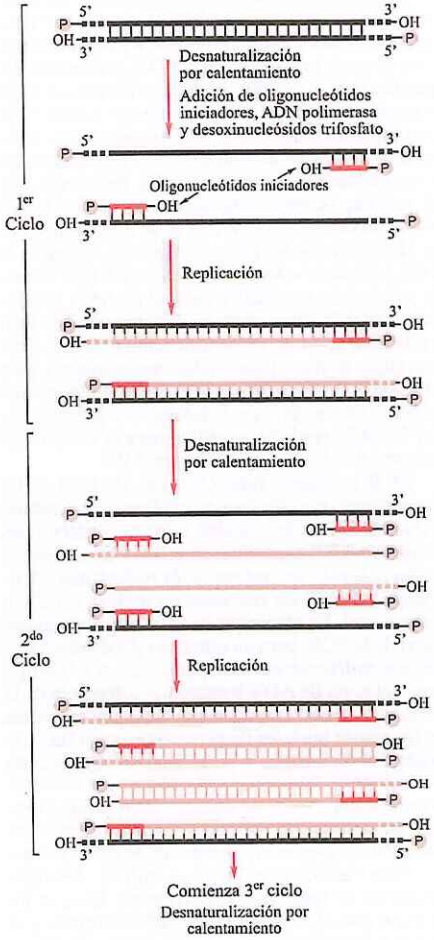


Fig. 21-11. Representación esquemática de la reacción en cadena de la polimerasa.

de veces y la casi totalidad del ADN en la preparación corresponde al segmento inicialmente elegido. Se obtienen cantidades aptas para diversos estudios, incluso análisis de secuencia. En la actualidad se cuenta con equipos que efectúan el procedimiento en forma automática.

Para amplificar ARN mensajero se utiliza una variante de la PCR conocida como *transcripción reversa* seguida de reacción en cadena de la polimerasa. Esta técnica, designada con las siglas RT-PCR (del inglés *Reverse Transcription PCR*), consiste en dos etapas. En la primera se realiza la transcripción *in vitro* de ARN mensajero celular en el ADN correspondiente, utilizando oligonucleótidos complementarios con las secuencias que flanquean el área de interés en el ARN y una transcriptasa inversa que actúa como ADN polimerasa dependiente de ARN. En una segunda etapa, el ADN transcripto, o ADN complementario (ADNc), se amplifica mediante PCR convencional. Los niveles de ADNc que se sintetizan son proporcionales a las cantidades iniciales de ARN, de manera que el método es semicuantitativo. La detección del ADN producido en la RT-PCR se realiza mediante electroforesis en geles de agarosa. Mientras la PCR permite el estudio de ADN, la RT-PCR detecta y estima la cantidad y calidad de ARN mensajero específico expresado en distintas células. Esto es de gran valor en la identificación de genes activos en un tejido o tipo celular determinado y para el estudio de cambios en la expresión génica que ocurren en condiciones fisiológicas y patológicas. La RT-PCR también se utiliza para el estudio del genoma de virus compuestos por ARN.

PCR a tiempo real. Otro tipo de PCR se ha desarrollado no sólo para amplificar, sino también para determinar la cantidad relativa o número de copias de ADN específico en células. Se lo conoce como *reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa* (Q-PCR en las siglas en inglés), o *PCR a tiempo real*. La técnica se basa en el principio general de la PCR, pero en este caso el método determina simultáneamente en cada ciclo, o a "tiempo real", el nivel de ADN formado. A diferencia de la PCR tradicional, la estimación del ADN se realiza en las etapas iniciales de la reacción, en la fase exponencial de síntesis y no al final de ella, cuando la reacción es limitada por el consumo de los componentes del medio de ensayo. Esto proporciona alta sensibilidad al método y permite determinar con relativa precisión la cantidad de ADN formado. Para cuantificar el ADN se utilizan dos tipos diferentes de moléculas fluorescentes. Unas se intercalan con el ADN de doble hebra formado y al unirse a él emiten fluorescencia. Otras, son oligonucleótidos modificados o sondas que transmiten fluorescencia al hibridar con secuencias definidas del ADN sintetizado. Mientras que en el primer caso se reconoce cualquier tipo de ADN, en el segundo, más específico, sólo se identifican secuencias determinadas del ADN. En ambos, los niveles de fluorescencia dependen de la cantidad de ADN producido, el que a su vez es proporcional a las moléculas de ADN inicialmente presentes en la muestra en estudio. Frecuentemente la cantidad de ADN se expresa en términos relativos, por comparación con la de PCR de diluciones conocidas del ADN realizada en paralelo. La Q-PCR se efectúa no sólo para determinar los productos de PCR, sino también los de RT-PCR. Las aplicaciones de la Q-PCR son numerosas, e incluyen el estudio de los niveles de expresión de un determinado gen en diferentes tipos celulares, en distintos momentos del desarrollo y diferenciación celular, o para conocer el efecto activador o represor de agentes que afectan la transcripción génica. Además, es importante para detectar el nivel de genes marcadores de patologías infecciosas y cáncer.

Fingerprinting de ADN

Entre las familias de ADN repetitivo dispersas en el genoma se encuentran las *repeticiones en tándem de número variable* (en inglés *variable number of tandem repeats*, VNTR) también llamadas *minisatélites*. Cada unidad repetida comprende una secuencia de 16 a 64 pares de bases.

La utilización de enzimas de restricción específicas para los sitios que flanquean las VNTR permite obtener fragmentos cuya longitud varía de un individuo a otro porque cada uno posee distinto número de repeticiones. Los fragmentos también pueden obtenerse y multiplicarse por PCR, utilizando *primers* complementarios con las secuencias flanqueantes de los VNTR.

Las unidades que se repiten en cada grupo tienen secuencias conservadas y es posible preparar sondas para reconocerlas.

Una preparación de minisatélites de un individuo, analizada mediante *Southern blotting*, da un patrón de bandas característico. Excepto gemelos univitelinos, es altamente improbable la existencia de dos sujetos con el mismo patrón. Es un carácter individual, como las huellas digitales (en inglés, *fingerprints*). El método, llamado *DNA fingerprinting*, es muy utilizado para identificar a una determinada persona en casos forenses, o establecer maternidad o paternidad. Los minisatélites tienen herencia mendeliana, de modo que parte de las bandas detectadas en un individuo serán comunes con las de la madre y otras con las

del padre. Gracias a la técnica de PCR, ínfimas cantidades de ADN, como las existentes en una gota de sangre o semen, o en un cabello, bastan para realizar un *fingerprinting*.

Clonación de genes

La palabra clonación, o clonado, indica la obtención de células o individuos genéticamente idénticos. Una población celular cuyos integrantes derivan todos de una misma célula progenitora constituye un clon. Aplicado a genes, el vocablo tiene un sentido algo diferente. Las expresiones "clonación de genes" o "clonado molecular" designan la obtención de numerosas copias de un segmento definido del genoma de un organismo dado, que se replica insertado en el ADN de una célula hospedera.

El aislamiento de un gen de una célula de mamífero, por ejemplo, donde coexiste con decenas de miles de otros genes, y su multiplicación selectiva fuera de su entorno nativo, eran hazañas impensables hace unos pocos años. Actualmente, gracias al desarrollo de la ingeniería genética, es posible realizarlas.

Aislamiento del gen. Es la primera etapa a cumplir para llegar a la clonación. Se mencionará una de las estrategias utilizadas para lograr ese propósito.

1. **Preparación de ADN recombinante.** Una de las técnicas empleadas es la de "perdigonada" (en inglés, *shotgun*). En ella, todo el ADN aislado de células del organismo del cual deseamos obtener el gen es seccionado en segmentos apropiados para su recombinación (entre 2.000 y 20.000 pares de bases de longitud) utilizando una endonucleasa de restricción. El genoma humano, por ejemplo, podría ser cortado en cientos de miles de trozos. Posteriormente, estos fragmentos son introducidos en vectores adecuados (fagos) mediante métodos de recombinación de ADN como los indicados. De esta manera, toda la información genética de las células "donantes" es repartida en los fagos, cada uno de los cuales recibirá un trozo del genoma injertado. Alguno de los vectores debe alojar el fragmento correspondiente al gen buscado.

Los fagos con ADN recombinante se introducen en bacterias (*E. coli*), dentro de las cuales han de replicarse. Tomando algunas precauciones es posible lograr que sólo un fago penetre en cada célula. Las bacterias se siembran en placas con medio de cultivo diluidas lo suficiente para permitir que cada bacteria, al multiplicarse, forme una colonia separada de las otras y sea fácilmente individualizable. Distribuidas en las placas, se formarán miles de colonias. Cada una de ellas constituye una población clonal o clon celular, pues deriva de una sola célula madre; por lo tanto, todas las bacterias integrantes de una colonia poseerán el mismo trozo de ADN foráneo, que se replica en la célula hospedera (fig. 21-12).

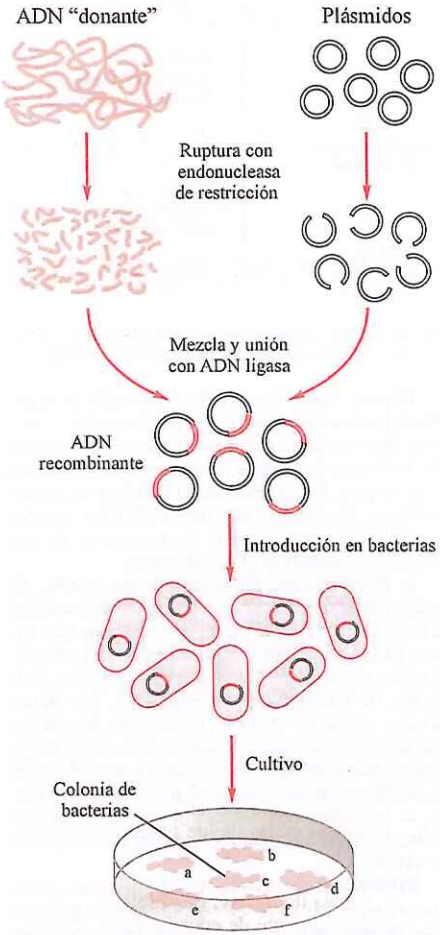


Fig. 21-12. Clonación de genes. Las colonias de bacterias desarrolladas, cada una de las cuales constituye una población clonal poseedora de un trozo distinto del genoma "donante", representan en conjunto una "biblioteca de genes"

El conjunto de clones entre los cuales están distribuidos todos los fragmentos del ADN "donante" constituye una *"biblioteca genómica"* o *"genoteca"*.

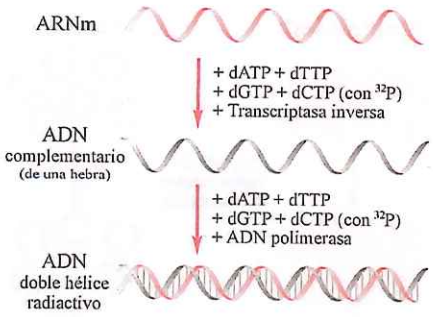


Fig. 21-13. Preparación de una sonda de ADN copia (ADNc) a partir de ARNm correspondiente al gen que se busca.

El paso siguiente consiste en identificar la población clonal portadora del gen buscado, operación que se simplifica si se dispone de un trozo de ADN idéntico, o que posea segmentos iguales, a dicho gen. Segmentos de ADN con esas características, llamados ADN copia (ADNc), pueden ser utilizados como sonda para localizar en qué colonia se encuentra el gen deseado.

2. **Preparación de la sonda de ADNc.** Se puede partir de células que sintetizan en cantidad la proteína codificada por el gen buscado (por ej., para genes de globina, células precursoras de eritrocitos; para el gen de proinsulina, células β de islotes de Langerhans del páncreas). En dichas células existe un franco predominio de ARNm que dirige el ensamble de la proteína, razón por la cual es más fácil aislarlo en forma pura. Obtenido el ARNm correspondiente al gen que nos interesa, se lo utiliza como molde para sintetizar una hebra de ADN complementario por transcripción invertida.

Bibliotecas de ADNc. Las bibliotecas genómicas, especialmente de eucariotas con genoma muy grande, son poco eficientes para encontrar un gen determinado porque alrededor del 95% del ADN total es no codificante. Resultan más convenientes las bibliotecas de *ADN copia*, preparadas a partir del ARN maduro total de células o tejidos. Este ARNm es utilizado de molde para la síntesis de ADN complementario (ADNc) con transcriptasa inversa. Los ADNc obtenidos, complementarios de los ARNm maduros, poseen exclusivamente la información para la síntesis de las proteínas que la célula produce y no contiene intrones (ver capítulo siguiente) u otras porciones no codificantes del genoma.

A fin de obtener una sonda de ADNc radiactivo, se agregan los desoxirribonucleósidos trifosforados dATP, dTTP, dGTP y dCTP marcados con ^{32}P en el primer fosfato. Por acción de la transcriptasa inversa, estos nucleótidos son ensamblados sobre la guía de ARNm, formando una cadena de ADN complementaria. A partir de ella se puede preparar ADN de doble hebra, utilizando los nucleótidos radiactivos citados y ADN polimerasa (fig. 21-13).

Existen varios métodos, distintos del indicado, para obtener sondas de ADNc. Seleccionando el más adecuado en cada caso, puede prepararse ADNc de cualquier gen, aun cuando codifique proteínas de muy escasa concentración en las células.

3. **Identificación del clon portador del gen.** Se aplica un disco de nitrato de celulosa sobre el cultivo, de modo que contacte con las colonias desarrolladas en la placa. Parte de cada una de las colonias es transferida al disco, dejando en éste una impronta del cultivo. Las bacterias adheridas al nitrato de celulosa en esta réplica o calco del cultivo (fig. 21-14) son lisadas y su ADN es fijado al papel en el lugar que ocupaba la colonia original. Se procede a desnaturalizar el ADN (separación de las dos hebras) por calentamiento. En estas condiciones se vierte sobre el disco una solución del ADNc, también desnaturalizado. Por enfriamiento lento se produce reasociación de cadenas complementarias. Se producirá hibridación entre el ADNc radiactivo y el ADN fijado en el papel, en el lugar donde se encuentre el gen buscado. Entonces se elimina el exceso de ADNc por lavado del papel y se coloca sobre éste una película radiográfica. En los sitios en los cuales existe ADN híbrido se impresiona la película (autorradiografía), lo cual permite ubicar en el cultivo la colonia portadora del gen que interesa.

Una vez identificada la colonia de bacterias, se resiembran en un medio de cultivo en el cual se han de multiplicar separadas del resto de colonias. El gen ha sido clonado; se dispone ahora de millones de células que continúan replicándolo, aislado del resto del genoma al cual pertenecía originalmente.

4. **Expresión de genes clonados.** No siempre un gen extraño, introducido en el genoma de un organismo receptor, puede ser expresado. Muchas veces sigue replicándose, pero no es transcripto a ARNm y, por ende, no se produce la proteína a la cual codifica. En estos casos suele procederse a recuperar el gen de la célula donde fue clonado y reimplantarlo en otro vector más eficiente. Si se logra la inserción en el genoma del hospedador en un sitio contiguo a la zona correspondiente al promotor, el gen puede llegar a expresarse con una actividad aún mayor de la que poseía en su célula de origen.

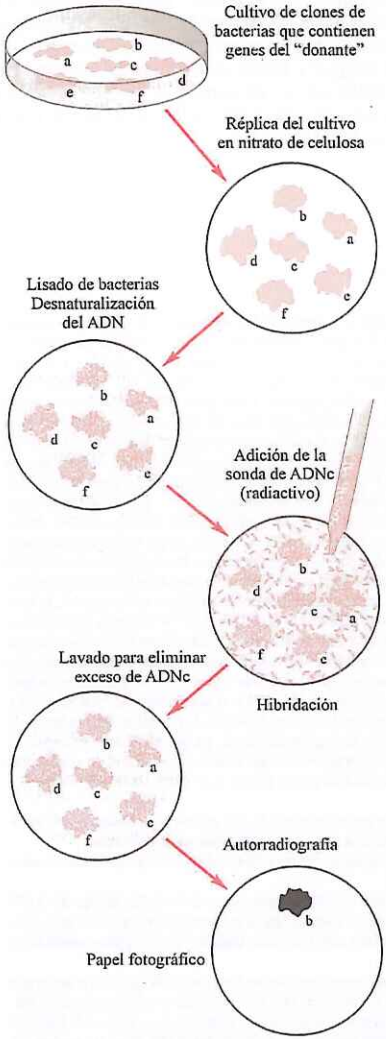


Fig. 21-14. Identificación mediante ADNc radiactivo de la colonia portadora de un gen determinado. En el ejemplo ilustrado, la colonia b posee el gen que se busca.

Aplicación de técnicas de ADN recombinante

Producción de proteínas de uso terapéutico. La introducción en bacterias de información genética para elaborar proteínas humanas tiene ya un importante desarrollo industrial. Se producen en cantidad proteínas de uso terapéutico, entre ellas insulina, hormona de crecimiento, interferón, eritropoyetina, factor VIII, interleuquinas y factores estimulantes del crecimiento de colonias.

Producción de vacunas de ADN. El sistema inmune responde al ingreso de proteínas extrañas (antígenos) con la producción de anticuerpos (cap. 29). La vacunación tradicional consiste en introducir en el organismo a inmunizar agentes infecciosos muertos o atenuados por distintos medios, que actúan como antígenos y desencadenan la síntesis de anticuerpos específicos.

Hace unos 15 años se empezó a investigar con vacunas de ADN procesado mediante ingeniería genética. Una de las técnicas usadas es la administración, por vía dérmica, subcutánea o intramuscular, de plásmidos injertados con la secuencia de ADN que codifica para una proteína antigénica, viral o bacteriana. El plásmido penetra en los núcleos de las células (queratinocitos, miocitos, células presentadoras de antígenos) del tejido inyectado y, después de la incorporación de esa información genética, se expresa la proteína correspondiente. El organismo reconoce la proteína como foránea y desencadena una respuesta inmune humoral y celular con producción de anticuerpos y activación de células T (cap. 29).

La vacuna de ADN no tiene los riesgos que eventualmente presentan las vacunas tradicionales, principalmente porque no se introducen gérmenes, ya sean atenuados o muertos, que puedan producir reacciones indeseables.

Actualmente se están utilizando vacunas de ADN en ensayos clínicos en humanos con diferentes procesos patológicos (sida, cáncer). Los resultados son alentadores, especialmente con respecto a la seguridad del procedimiento. En animales se han mostrado efectivas en varias enfermedades; ya se han autorizado cuatro de estas vacunas para uso veterinario.

Terapia génica. La introducción de genes normales en células con genes defectuosos es hoy posible gracias a las técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, se ha logrado incorporar *in vitro* el gen que codifica hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa en células de tejido conjuntivo de pacientes con enfermedad de Lesch-Nyhan, carentes de esa enzima. Dichas células, en cultivo, son así "curadas" de su defecto. Se abren de este modo nuevas perspectivas para alteraciones genéticas que no tienen solución hasta ahora. Se han realizado, con buenos resultados, pruebas clínicas en pacientes con inmunodefi-

ciencia severa combinada a los cuales se les introdujo el gen normal de adenosina desaminasa en células de médula ósea.

La transferencia de genes a células somáticas corrige el defecto sólo en el tejido tratado; las células germinales no son modificadas. Si bien eventualmente podría alcanzarse la curación clínica, el individuo sigue transmitiendo la alteración a su descendencia. La manipulación genética con células germinales humanas plantea riesgos y serios problemas de carácter ético; actualmente no es permitida por los organismos oficiales supervisores de la investigación científica en muchos países.

RESUMEN

Biosíntesis de ADN. Cuando una célula se divide, la doble hélice se separa y sobre cada hebra se sintetiza una complementaria. El proceso es llamado duplicación o *replicación* y se dice que es semiconservador. En células eucariotas la separación tiene lugar en la fase S del ciclo celular y empieza simultáneamente en todos los cromosomas y en muchos sitios de cada uno. Las dos cadenas que se separan forman la "horquilla de replicación". En cada una de las zonas o "burbujas" de separación se producen dos horquillas, que avanzan en sentido opuesto. La enzima desenrollante o *helicasa* separa las cadenas del ADN. Proteínas fijadoras de ADN monocatenario (SSB o proteína de replicación A, RPA) se unen a las hebras e impiden que vuelvan a asociarse. *Topoisomerasas* evitan las tensiones que origina el desenrollamiento. La nueva cadena de ADN se ensambla por adición de nucleótidos complementarios sobre el molde que ofrece cada una de las hebras del ADN original. La formación de uniones fosfodiéster 5'-3' es catalizada por ADN polimerasas. En bacterias se han aislado 3 (I, II y III) y en eucariotas, 5 (α, β, γ, δ y ε). La cadena crece en sentido 5'⟶3'. Las unidades estructurales utilizadas para la síntesis ingresan como desoxirribonucleósidos trifosfato (dATP, dGTP, dTTP y dCTP). Antes del ensamble de la cadena de ADN se requiere un trozo de ARN de unas 10 bases que actúa como iniciador o cebador sintetizado por la *primasa*, firmemente unida a polimerasa α. La *ADN polimerasa* α une unos 20 desoxirribonucleótidos al extremo 3' del ARN "cebador", después de lo cual el complejo polimerasa α-primasa se separa de la hebra guía desplazada por el factor C de replicación (RFC), que también fija PCNA. La elongación es continuada por polimerasa δ, la cual se desliza sobre la cadena molde y se mantiene junto a ella gracias a PCNA. Como la "lectura" de la hebra guía se hace en el sentido 3'⟶5', antiparalelo al de avance de la síntesis, una de las cadenas puede ser ensamblada en forma continua (*hebra líder conductora o adelantada*), pero la otra debe ser sintetizada en trozos, los *fragmentos de Okazaki*, cada uno precedido por un ARN iniciador (ARN_i), a medida que se separa una porción de ADN de extensión adecuada. A la cadena sintetizada en segmentos se la llama *hebra retardada* o *rezagada*. Los trozos de ARN_i son eliminados por ARNasa HI y FEN1y los espacios vacantes cubiertos por segmentos de ADN sintetizados por polimerasa δ. La unión de extremos de fragmentos adyacentes es catalizada por *ADN ligasa*. La duplicación tiene gran exactitud, ya que el sistema es capaz de corregir posibles errores. Las ADN polimerasas δ, β y ε actúan en el sistema corrector. *Telomerasas*. Agregan secuencias repetidas en los extremos de cromosomas (telómeros) y reponen la pérdida que se produce en cada duplicación debida a la eliminación del ARN iniciador en los extremos 5'.

Reparación de ADN. Comprende reparación: a) de errores de apareamiento, b) por escisión de bases, c) por escisión de nucleótidos, d) por ruptura de las dos cadenas del ADN. Está a cargo de complejos multiproteicos.

Recombinación de ADN. Se produce en gametas durante la meiosis. Se recombina ADN de cromosomas homólogos con intercambio de segmentos entre las dos dobles hélices.

Endonucleasas de restricción. Seccionan uniones fosfodiéster en sitios específicos de la doble hélice de ADN formados por un trozo de 4 a 7 pares de bases en el cual el segmento de cada hebra es autocomplementario si se lo rota 180° (fragmentos palindrómicos). El corte suele realizarse en distinto nivel de cada cadena; los extremos resultantes presentan cabos de una sola hebra (extremos "adhesivos").

Biosíntesis de ARN. El ensamble de una cadena de ARN complementario sobre una de ADN que sirve de molde es llamado *transcripción*. Es catalizado por *ARN polimerasas*. En bacterias, la ARN polimerasa es un complejo oligomérico. La subunidad σ reconoce el sitio promotor. El promotor posee dos "cajas" ubicadas en –10 y –35. Cuando la ARN polimerasa se une a la doble hélice, ésta se desenrolla. Sólo una de las cadenas del ADN sirve de molde. Se utilizan ribonucleósidos trifosforados (ATP, GTP, CTP y UTP). La polimerización progresa en sentido 5'⟶3'. En eucariotas existen tres ARN polimerasas. La I, localizada en el nucléolo, cataliza la síntesis de ARNr 5,8S, 18S y 28S. La II se encuentra en el nucleoplasma y es encargada de la síntesis de ARN precursor de ARNm. La III, también en el nucleoplasma, sintetiza ARN de transferencia y otros ARN de molécula pequeña. La interacción promotor-enzima está a cargo de factores de transcripción. Los factores de transcripción generales o basales se designan con las siglas TF seguidas de un número romano correspondiente a la polimerasa con la cual actúan y otra letra (de A a H). *Síntesis de ARNm*. El promotor suele comprender 3 sitios: la caja TATA en posición –25, la CAAT en –40 y la GC en –110. Además de promotores, se encuentran secuencias potenciadoras o *enhancers*. La transcripción se inicia con la unión de TFIID a la caja TATA; luego se forma un complejo con otros factores, entre ellos TFIIH, que fija la polimerasa II en la posición correcta. La enzima se desprende del complejo e inicia la transcripción. El extremo 5' de la cadena de

ARN recién sintetizada recibe un "capuchón" o *cap* de 7-metil-guanosina trifosfato que contribuye a darle estabilidad. En el extremo 3' se agregan de 100 a 200 nucleótidos de adenina ("cola" poli A). Secuencias específicas ubicadas poco antes del extremo final sirven de señales de poliadenilación. Posteriormente los ARN precursores son procesados en el núcleo hasta alcanzar su "madurez".

Transcriptasa inversa. Existe un proceso de transcripción invertida, que permite la síntesis de ADN utilizando ARN como molde. Es catalizado por *transcriptasa inversa*, enzima inicialmente aislada de retrovirus.

BIBLIOGRAFÍA

Alberts B., Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, 5ta. Ed., Taylor & Francis Group, Nueva York.

Baker T.A., Bell S.P. (1998). Polymerases and the replisome: machines within machines. *Cell*, 92: 295-306.

Collins F.S., Ginsburg D., Waga S., Stilman B. (1998). The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annual Review of Biochemistry*, 67: 721-751.

Cooper G.M., Hausman R.E. (2007). *The Cell. A Molecular Approach*, 4ta. Ed., Sinauer Associates, Inc. Sunderland.

Ishmael F.T., Stellato C. (2008). Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician. *Annals of Allergy, Asthma, and Immunology*, 101: 437-443.

Kornberg R.D. (2005).Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends in Biochemical Sciences*, 30: 235-239.

Krebs J.E., Goldstein E.S., Kilpatrick S.T. (2013). *Lewin's Genes XI*, Jones and Bartlett Publishers Inc., Burlington.

Lodish H., Berk A., Kaiser C.A., Kriger M. (2007). *Molecular Cell Biology*, 6ta. Ed., W.E. Freeman, Nueva York.

Morita R. et al. (2010). Molecular mechanisms of the whole repair system: a comparison of bacterial and eukaryotic systems. *Journal of Nucleic Acids*, 2010: 1-32.

Murphy J., Bustin S.A. (2009). Reliability of real-time reverse-transcription PCR in clinical diagnostics: gold standard or substandard? *Expert Reviews in Molecular Diagnosis*,9: 187-197.

Poss Z.C., Ebmeier C.C., Taatjes D.J. (2013). The mediator complex and transcription regulation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 48: 575-608.

Turner R. (Ed.).(2002). RNA. *Nature*, 418: 213-258.

Watson J.D., Baker T.A., Bell S.P. Gann A., Levine M., Losick R. (2008). *Molecular Biology of the Gen*, 6ta. Ed., Pearson Benjamin Cummings, Cold Spring Harbor Laboratory Press, San Francisco.

Weaber R.F. (2008). *Molecular Biology*, 4ta. Ed., Mc Graw Hill, Nueva York

CAPÍTULO 22

La información genética (II). Biosíntesis de proteínas

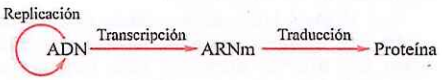
La información genética, transmitida de padres a hijos y de generación celular a generación celular, está determinada por la estructura primaria del ADN. La secuencia de nucleótidos a nivel de los genes constituye un "mensaje en clave" que indica la composición exacta de los ARN y proteínas a sintetizar.

La capacidad de replicación del ADN, esto es, su aptitud para dirigir la síntesis de copias exactas de sí mismo, asegura que todas las células de un individuo, originadas por divisiones sucesivas de la célula huevo, posean en sus núcleos un ADN idéntico, con el mismo potencial. Las unidades funcionales de este material heredado son los *genes*, es decir, los segmentos de la molécula de ADN que sirven de guía en la síntesis de los distintos tipos de ARN: mensajeros, ribosomales, de transferencia, nucleares pequeños y no codificantes (cortos y largos). Los ARN tienen asignadas misiones particulares en el proceso de síntesis de proteínas, pero sólo los ARN mensajeros (ARNm) contienen la "clave" para el ordenamiento de aminoácidos en las moléculas de las proteínas a elaborar.

El mensaje genético, cifrado en la secuencia de las bases A, G, C y T de la molécula de ADN, es transcripto a otra de ARN, en la cual se expresa con las bases A, G, C y U. Si bien los genes suministran información para la síntesis de todos los ARN, en este capítulo interesan especialmente los genes responsables de la producción de ARN mensajero (ARNm), es decir, los segmentos de ADN nuclear que dirigen la síntesis del ARN del cual deriva el ARNm utilizado como "plantilla" para el ensamble de cadenas polipeptídicas en el citoplasma.

La estructura primaria de una proteína está dada por el ordenamiento de los aminoácidos en largas cadenas. En sentido figurado, puede decirse que ARNm y proteínas utilizan lenguajes distintos, expresados mediante símbolos diferentes. Resulta indispensable traducir la expresión original del mensaje polinucleotídico de cuatro caracteres (A, G, C y U) a su versión final en "lenguaje proteínico", cuyas unidades son los veinte aminoácidos.

Se acostumbra representar todo el proceso en forma resumida con la notación siguiente:



En este punto, cuando se introduce el término traducción para representar la transferencia del mensaje genético del ARNm al de proteínas, conviene aclarar algunos conceptos, ya que en los últimos años se ha difundido la denominación de medicina traductora (en inglés *translational medicine*) en la que traducción no tiene el mismo sentido.

Translational medicine se basa en la difusión de la aplicación a la práctica clínica de los nuevos conocimientos aportados por la investigación básica, ya sea en estudios con modelos animales, cultivos de tejidos u otros medios, no sólo en genómica o biología en general, sino también en ciencias como la de materiales o de la física, que puedan mejorar el estudio, diagnóstico y tratamiento de casos clínicos.

El código genético

La secuencia de bases púricas y pirimídicas de las hebras de ARN mensajero transcriptas de genes que codifican proteínas provee las directivas para el ordenamiento de los aminoácidos. Pero, ¿cómo es posible, con sólo cuatro bases, indicar la secuencia según la cual deben disponerse veinte aminoácidos? Aparentemente, si cada base correspondiese a un determinado aminoácido, sólo podría suministrarse información para acomodar cuatro aminoácidos. Si un aminoácido fuese indicado por un par de bases, las posibilidades se amplían: con las cuatro bases se pueden formar dieciséis (4^2) pares diferentes. Este número resulta aún insuficiente para tratar con 20 aminoácidos. El problema fue resuelto al demostrarse que un aminoácido es especificado por un conjunto de tres bases consecutivas o terno. Se ha impuesto el uso de la palabra *triplete* para designar un grupo de tres bases. Con las cuatro bases se pueden componer 64 tripletes diferentes (4^3). Utilizando un terno de bases por aminoácido se dispone de un número más que suficiente de combinaciones.

Ingeniosos experimentos permitieron establecer el significado de cada triplete. En otros términos, se descifró la "clave" del mensaje contenido en el ARN. Esa "clave" se conoce como *código genético*.

Cada aminoácido está representado por uno o más tripletes. Esos ternos de bases que constituyen las unidades del código genético se designan con el nombre de *codones*. La tabla 22-1 indica el significado de los 64 codones.

Para algunos aminoácidos existe más de un codón. Por ejemplo, arginina, leucina y serina tienen seis tripletes diferentes cada uno; cinco aminoácidos poseen cuatro codones y nueve, dos codones. Sólo metionina y triptófano son especificadas por un codón (AUG y UGG respectivamente). Los tripletes distintos correspondientes a un mismo aminoácido se denominan sinónimos (la existencia de varios tripletes para indicar el mismo aminoácido se conoce como *degeneración* o redundancia del código). Sin embargo, no existen ambigüedades; un determinado codón sólo indica un aminoácido.

En general, la tercera base del codón es la menos crítica; en muchos codones es posible cambiar la tercera base por otra sin modificar el significado (Tabla 22-1).

Los tripletes UAA, UAG y UGA no corresponden a aminoácidos (razón por la cual originalmente se los llamó sin sentido); indican *terminación* de la cadena polipeptídica. Así como se ha comparado a los otros tripletes con las "palabras" del lenguaje genético, los codones de terminación serían los signos de puntuación.

Tabla 22-1. Código genético.

Ác. aspártico	GAU – GAC
Ác. glutámico	GAA – GAG
Alanina	GCU – GCC – GCA – GCG
Arginina	CGU – CGC – CGA – CGG – AGA – AGG
Asparragina	AAU – AAC
Cisteína	UGU – UGC
Fenilalanina	UUU – UUC
Glicina	GGU – GGC – GGA – GGG
Glutamina	CAA – CAG
Histidina	CAU – CAC
Isoleucina	AUU – AUC – AUA
Leucina	UUA – UUG – CUU – CUC – CUA – CUG
Lisina	AAA – AAG
Metionina	AUG
Prolina	CCU – CCC – CCA – CCG
Serina	UCU – UCC – UCA – UCG – AGU – AGC
Tirosina	UAU – UAC
Treonina	ACU – ACC – ACA – ACG
Triptófano	UGG
Valina	GUU – GUC – GUA – GUG
Codones de terminación	UAA – UAG – UGA

A: adenina, G: guanina, U: uracilo, C: citosina

El código genético tiene validez universal, es decir, los codones tienen el mismo significado en todos los seres vivos. Sin embargo, el genoma propio de mitocondrias utiliza un código ligeramente diferente del nuclear. También se han observado variaciones del código en algunos organismos. Por ejemplo, el codón AGA, que significa arginina en el código estándar, indica terminación en mitocondrias de algunos animales, o serina en las de otros. UGA, que en el código común significa terminación, en mitocondrias de mamíferos y de levadura corresponde a triptófano; CUA indica leucina en el código general y treonina en el de mitocondrias de levadura; UGA y UAG generalmente corresponden a terminación y glutamina en el núcleo de protozoos.

ADN nuclear

Los genes que codifican para proteínas contienen información que, transcripta a ARNm, sirve para dirigir el ordenamiento de aminoácidos de los polipéptidos correspondientes. Conjuntos de

tres bases consecutivas en el ARNm forman las unidades del código genético o codones; 61 de los 64 codones posibles especifican aminoácidos; los tres restantes indican terminación de la cadena polipeptídica. La sucesión de tripletes o codones corresponde a la secuencia de aminoácidos en la molécula de proteína para la cual codifica el gen original.

El conjunto de codones con la información completa para la síntesis de una cadena polipeptídica se denomina cistrón. El gen que codifica para una proteína de unos 300 aminoácidos (tamaño promedio) debería tener una extensión de 900 nucleótidos, transcripto en ARNm de igual extensión.

En bacterias, en general, cada cistrón es un trozo de ADN, cuya secuencia de bases se corresponde, en la gran mayoría de genes, con la de codones en el ARNm transcripto y ésta con la de aminoácidos en la proteína sintetizada con esa información.

El genoma bacteriano, es decir, el total de ADN en su cromosoma, contiene en promedio algo más de cuatro millones de pares de bases. Esta cifra está más o menos de acuerdo con la cantidad de ADN requerida para codificar las proteínas que una bacteria produce.

En cambio, en animales superiores existe un gran exceso de ADN en relación con las necesidades de codificación de proteínas; se estima que menos del 2% del total de ADN codifica proteínas. En humanos, el genoma haploide comprende alrededor de tres mil millones de pares de bases, mucho más que las necesarias para codificar las cadenas polipeptídicas que se sintetizan. El número total de unidades de información (genes) en el ser humano es de alrededor de 21.000.

A diferencia de los genes de bacterias, en los eucariotas esas unidades no están constituidas por trozos continuos de ADN codificante, sino divididas en segmentos denominados *exones*. Entre ellos se extienden porciones de ADN, aparentemente sin información, a las cuales se las llama secuencias intercaladas o *intrones*. En general, la extensión de los intrones supera largamente a la de los exones (fig. 22-1).

Por ejemplo, el gen de ovoalbúmina de gallina se encuentra en una porción de ADN de 7.700 bases de extensión. De éstas, sólo 1.158 codifican para la proteína y están divididas en ocho exones. La longitud de las secuencias intercaladas o intrones es casi seis veces mayor que la correspondiente a la información genética efectiva. En el ser humano, el gen de la globina contiene 2 secuencias intercaladas, el de la albúmina 14 y el del colágeno más de 40. Un caso extremo es el gen del factor VIII, proteína que participa en el proceso de coagulación de la sangre (pág. 695). Tiene una extensión de 186 kb y posee 26 exones. Los 25 intrones abarcan una extensión de más de 175 kb; es decir, la porción codificante es sólo alrededor del 5% del total del gen. Entre los pocos genes de mamíferos sin intrones, se encuentran los de histonas y de interferón.

Genes repetidos. Además de la presencia de intrones y otras secuencias no codificantes dispuestas entre los genes, contribuye a aumentar el tamaño del genoma de eucariotas la existencia de *genes repetidos*. En algunos casos en los cuales se requieren grandes cantidades del producto de un gen, como ARN ribosomales e histonas, existen múltiples copias de las respectivas porciones codificantes de ADN. El conjunto de copias múltiples de un determinado gen constituye una *familia de genes*. A veces, los genes miembros de una familia no son exactamente idénticos entre sí, ni transcriptos todos en el mismo tejido o simultáneamente. Por ejemplo, las subunidades de globina son codificadas por dos familias de genes (α y β). A la familia α pertenecen ζ, α_1 y α_2; la familia β comprende los genes ε, γ^G, γ^A, δ y β. Algunos se expresan en el embrión, otros en el período fetal y otros después del nacimiento (pág. 52). Los genes de la familia α están ubicados en el cromosoma 16 y los β, en el 11. En otros casos, miembros de una misma familia se encuentran dispersos en diferentes cromosomas.

Según la hipótesis más aceptada, los genes repetidos se han originado en el curso de la evolución por duplicaciones sucesivas de un gen ancestral. Los genes duplicados pueden sufrir mutaciones (ver más adelante) independientemente y

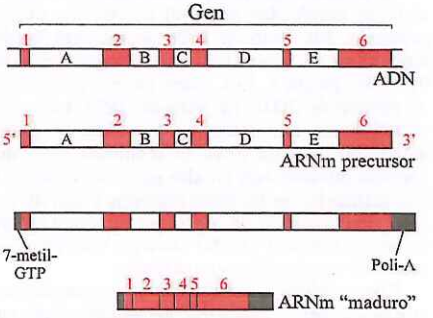


Fig. 22-1. Representación esquemática de la estructura de un gen de eucariotas que comprende seis exones y cinco intrones. El ARN precursor o transcripto primario es procesado para formar ARN "maduro". Los números indican los exones (en rojo) y las letras, los intrones (en blanco)

diferenciarse entre sí. Como resultado, al cabo de millones de años los genes de un grupo codifican proteínas homólogas, pero éstas presentan propiedades funcionales distintas. Por ejemplo, las subunidades γ de globina, producidas por genes de la familia β, dan a la hemoglobina fetal mayor afinidad por oxígeno (pág. 56).

Seudogenes. No todas las mutaciones resultan en producción de genes funcionantes. En algunas copias de genes el cambio puede hacerles perder la capacidad de codificar una molécula útil. Por ejemplo, dentro de cada una de las familias α y β de globina existen dos genes inutilizados por mutaciones. Estas copias inactivas de genes son llamadas *seudogenes*. Serían reliquias evolutivas; constituyen "chatarra" genética que aumenta el tamaño del genoma sin cumplir función aparente.

Proyecto genoma humano

En 1990 se inició un ambicioso proyecto cuyo propósito era determinar la secuencia de los 3 mil millones de pares de bases en el ADN de los 23 cromosomas que contienen la información completa del genoma haploide humano. La empresa era de una magnitud no igualada hasta entonces por intento alguno en el campo de las ciencias biológicas.

Se constituyó el llamado Consorcio Internacional para el Secuenciamiento del Genoma Humano, integrado por laboratorios oficiales de Estados Unidos, Gran Bretaña, Francia, Alemania, Japón y China. Se estimó que la tarea podría cumplirse en 15 años. En 1998, Celera Genomics, una compañía privada, comenzó a desarrollar sus trabajos con el mismo objetivo, aunque con metodología algo diferente de la utilizada por el Consorcio.

El perfeccionamiento y automatización de las técnicas empleadas permitió acortar los plazos previstos. En junio de 2000 se informó la obtención de un "borrador" que describía más del 90% del genoma. Los datos fueron publicados en febrero de 2001. En abril de 2003, todos los participantes anunciaron conjuntamente haber alcanzado la meta final: la secuencia total del genoma humano con un alto grado de exactitud. Los resultados se hicieron públicos y son de acceso libre. Ha sido un logro que sin duda tendrá un enorme impacto en las ciencias biológicas en general y en medicina en particular.

Los resultados arrojan datos sorprendentes: a) Existen menos genes que los anteriormente supuestos. Se estima actualmente que el número total de genes es de unos 21.000. b) Del total de bases, menos del 2% corresponden a exones; 24%, a intrones, y el resto a secuencias intergénicas, que no codifican proteínas. Gran parte de este ADN sirve de guía para la síntesis de ARN no codificante, los ARN pequeños o cortos y los largos, que tienen funciones regulatorias. En las regiones intergénicas se encuentran también las secuencias repetidas, que llegan a representar gran parte del genoma.

Nuevos desafíos se plantean a los investigadores: identificar y ubicar con exactitud, dentro de esa inmensa sucesión de bases, a todos los genes funcionantes y describir con precisión los mecanismos de regulación de su actividad.

El conocimiento del genoma humano crea grandes expectativas de aplicación en medicina: identificación de genes asociados a condiciones patológicas, detección precoz de predisposición genética a enfermedades, perfeccionamiento de terapias génicas, etc.

Junto a estos beneficios surgen problemas éticos y legales; por ejemplo, la posible utilización de estos datos para la discriminación de portadores de genes potencialmente perjudiciales.

ADN mitocondrial

Las mitocondrias contienen su propio genoma; en humanos comprende un total de 16.569 pares de bases, cuya secuencia ha sido determinada. Contiene 37 genes; 2 codifican ARN ribosomales, 22, ARN de transferencia y los 13 restantes, subunidades polipeptídicas componentes de complejos de la cadena respiratoria. Este genoma no es autosuficiente; la mayoría de las proteínas mitocondriales son codificadas en genes nucleares, sintetizadas en el citoplasma y transferidas a la organela por un sistema específico de importación. El ADN mitocondrial tiene características semejantes a las del ADN de procariotas y difiere del ADN nuclear en varios aspectos: 1. No posee intrones y prácticamente no tiene secuencias intergénicas. 2. El ADN mitocondrial de cada individuo no procede por partes iguales del padre y de la madre; es heredado sólo de la madre. Las mitocondrias del huevo fecundado proviene del óvulo; las del espermatozoide son eliminadas. 3. El genoma mitocondrial se divide independientemente del ciclo celular; no es replicado sincrónicamente con la división celular. 4. El código genético de mitocondrias difiere del "universal" en cuatro codones: UGA, terminación en el código estándar, especifica triptófano en mitocondrias; AGA y AGG, arginina, indican terminación y AUA, isoleucina, es metionina. 5. El genoma mitocondrial tiene mayor tasa de mutaciones (10 a 100 veces mayor) que el nuclear. Esto es debido a la falta de un sistema eficaz de reparación de ADN.

Los procesos de replicación, transcripción y traducción en mitocondrias son similares a los de organismos procariotas.

Se han descripto diversos cuadros patológicos causados por mutaciones y otras alteraciones del ADN mitocondrial, entre ellos encefalopatía mitocondrial, miopatía ocular, neuropatía óptica hereditaria de Leber, retinitis pigmentosa materna, epilepsia mioclónica, etc.

ARN mensajero (ARNm)

Durante el proceso de transcripción se sintetiza un ARN cuya secuencia de nucleótidos es complementaria con una de las hebras de ADN guía. En eucariotas, la ARN polimerasa II dependiente de ADN cataliza el ensamble de ARN mensajero.

Los genes transcriptos a ARN pueden encontrarse en cualquiera de las dos cadenas del ADN; sólo la hebra *antisentido* es transcripta. La otra cadena, llamada hebra *con sentido* o *codificante*, tiene igual secuencia que el ARN sintetizado (únicamente difiere en poseer timina donde la de ARN tiene uracilo).

Cada gen se transcribe en toda su extensión, incluyendo no sólo las porciones codificantes (exones) sino también las no codificantes (intrones). Este ARN original, precursor del ARNm o *ARNm primario*, forma parte del llamado ARN nuclear heterogéneo (ARNnh) y es sometido en el núcleo a importantes cambios.

En eucariotas, la existencia de membrana nuclear determina la separación neta entre el lugar de transcripción del ADN (núcleo) y el de traducción a proteínas (citoplasma). El ARNm debe pasar a través de los poros de la membrana nuclear y está expuesto, durante su recorrido, a degradación catalizada por nucleasas. Para prevenir la hidrólisis, el ARNm se une a proteínas que lo protegen. La necesidad de transporte desde el núcleo hacia el citoplasma exige mayor estabilidad del ARN mensajero eucariótico (vida media de horas o días) que del ARNm de procariotas, habitualmente degradado con gran rapidez (minutos). La "cola" de poli A está de algún modo vinculada con la vida media del ARNm e influye en la regulación de su expresión.

Procesamiento del ARNm precursor. El procesamiento postranscripción del ARNm no termina con el agregado del "capuchón" de 7-metilguanosinatrifosfato en el extremo 5' y de la "cola" de poli A en el 3', referidos en el capítulo anterior. La gran mayoría de las cadenas de ARNm primario contiene secuencias intercaladas o intrones que es necesario eliminar. Esos segmentos no codificantes son seccionados y los exones se empalman en el orden correcto para formar la cadena de ARNm "maduro", que servirá de plantilla en la síntesis de proteína. Este proceso de corte y empalme recibe, en inglés, el nombre de *splicing*.

La escisión de intrones y la unión ordenada, extremo a extremo, de los exones se realizan normalmente con extraordinaria precisión. Si se cometiesen errores en la elección del sitio de corte y empalme, se perturbaría notablemente la síntesis de la proteína correspondiente.

RNPnp. En el núcleo existe un conjunto de partículas, las *ribonucleoproteínas nucleares pequeñas* (RNPnp, en inglés snRNP), que cumplen un papel importante en el *splicing*. Es común en la literatura la utilización del término *snurps* para designar a las snRNP.

Las RNPnp están constituidas por proteínas unidas a cadenas de ácido ribonucleico de unos 100 a 300 nucleótidos de longitud, generalmente ricas en uracilo, razón por la cual se las denomina con la letra U; para distinguir las distintas RNPnp se agrega un número (U1, U2, U3, etc.).

Splicing. Los intrones tienen una extensión que varía entre 60 y 10.000 bases cada uno. Todos empiezan con GU (extremo 5') y terminan con AG (extremo 3'). Estas bases forman parte de secuencias consenso que abarcan un tramo relativamente corto en cada extremo. Además de secuencias consenso terminales, hay otra situada entre las posiciones –20 y –50 con respecto al extremo 3' del intrón, llamada *lugar de ramificación* (en levadura, esta secuencia es UACUAAC). Fuera de estos sitios, no hay homologías en la secuencia de intrones distintos.

El *splicing* se inicia con la formación de un complejo integrado por varias RNPnp y proteínas unidas al ARN precursor. El conjunto es designado *spliceosome*, palabra sin equivalente en español.

Uno de los RNPnp, llamado U1, posee un tramo de ARN con secuencia complementaria a la existente en las proximidades del extremo 5' de los intrones. Esto le permite aparearse al ARN precursor en el sitio de corte del terminal "izquierdo" del intrón. Por un mecanismo similar, una partícula RNPnp U2 se une a la secuencia de ramificación. Luego se agregan al complejo U4 y U6, que forman un solo bloque, y U5. El ARN precursor es seccionado en el extremo 5' del intrón. No se trata de una hidrólisis, sino de una reacción de transesterificación, es decir, se establece una nueva unión fosfodiéster entre el extremo 5' del intrón y el OH del C2 de la ribosa de un nucleótido de adenina en el sitio de rami-

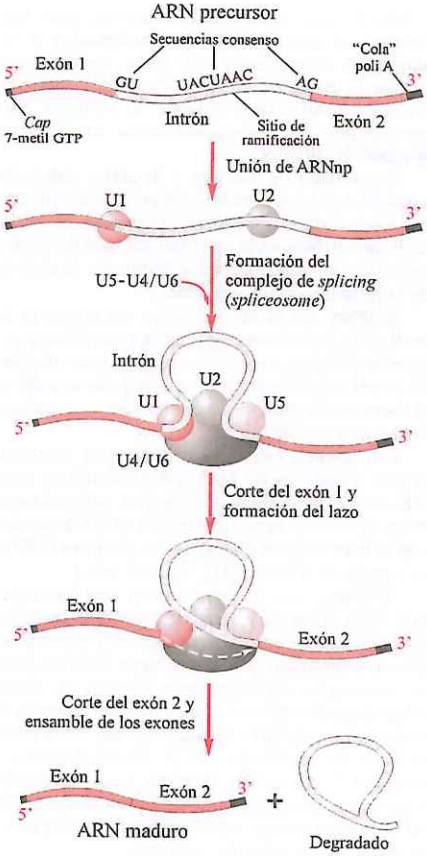


Fig. 22-2. Representación esquemática del proceso de *splicing* del ARNm.

ficación. Como resultado de esta reacción se forma un lazo (en inglés *lariat*). A continuación se escinde la unión del extremo 3' del intrón y éste queda libre. Una nueva transesterificación forma un puente diéster 3'–5' entre el extremo 3' del exón situado a la izquierda (exón 1 en la figura 22-2) con el 5' del ubicado a la derecha (exón 2 en la figura); el intrón en forma de lazo es liberado y degradado por hidrólisis en el núcleo.

En general, los exones codifican para los denominados "dominios funcionales" de las proteínas. Por ejemplo, las cadenas pesadas de inmunoglobulinas presentan tres dominios en la porción constante (CH1, CH2 y CH3), cada uno de los cuales es codificado por un exón diferente (véase cap. 29).

Procesamiento diferencial. Un determinado ARNm precursor puede generar diferentes ARNm maduros.

El proceso de maduración del ARN mensajero permite a veces generar proteínas diferentes a partir del mismo gen. En el transcripto primario existe a veces más de un sitio donde puede insertarse la cola de poli A. Según el lugar en el cual se efectúe el corte y la poliadenilación, resultarán diferentes ARNm maduros, que codifican para proteínas distintas. Un ejemplo es el del ARNm que dirige la síntesis de calcitonina, hormona de tiroides. En la hipófisis se produce un transcripto primario idéntico, pero luego del procesamiento se forma un ARNm para la síntesis de un neuropéptido. El gen original presenta dos sitios posibles de poliadenilación; según cuál de ellos se utilice, se forman mensajeros maduros diferentes.

Además, es posible empalmar todos los exones presentes en el transcripto primario, o sólo algunos de ellos (*splicing alternativo*). De esta manera, a partir del mismo ARN precursor se generan proteínas diferentes. El *splicing* alternativo resulta así un mecanismo que determina qué información es transmitida finalmente entre transcripción y traducción.

Otro mecanismo de modificación del transcripto primario es el de *edición del ARNm*. Se pueden introducir o eliminar bases y modificar el significado de un codón, crear un sitio de *splicing*, o alterar la estructura del ARN.

Un ejemplo notable de este tipo de "edición diferencial" es el del gen de la apolipoproteína B_{100}. En hígado, el ARNm transcribe los exones completos, sin modificación, que codifican para una cadena polipeptídica de 512 kDa (apolipoproteína B_{100}). En intestino, el ARNm es "editado"; en un determinado punto de la hebra se cambia una base C por U y se crea un codón de terminación. La proteína resultante, apo B_{48}, es más corta que apo B_{100}, con una estructura primaria igual a la del 48% inicial de apo B_{100}.

Los genes de los cuales se origina más de un ARNm maduro son denominados *unidades de transcripción compleja*.

Enfermedades por alteraciones del *splicing*. Los cambios en la secuencia de ADN (mutaciones) pueden provocar modificaciones, tanto en el ARN mensajero precursor, como en el complejo o spliceosoma que reconoce los sitios de corte y une los exones, o en los factores reguladores, y afectar el proceso de *splicing*; estos defectos suelen manifestarse con diversos cuadros clínicos. En algunos casos, síndromes con compromiso de los sistemas muscular o nervioso, como distrofia miotónica, atrofia muscular espinal, ataxia telan-

giestásica, también mencionada en alteraciones de la reparación de ADN; en otros, hay predisposición a transformación maligna de células, a enfermedades autoinmunes o a envejecimiento prematuro. .

Las *talasemias* son anemias debidas a fallas genéticas en la síntesis de globina; en algunos casos se han demostrado alteraciones en el *splicing*. En pacientes con *lupus eritematoso*, enfermedad autoinmune, se ha demostrado la presencia de anticuerpos específicos contra diversas ribonucleoproteínas, entre ellas RNPnp U1. Estos anticuerpos inhiben el empalme de los exones.

ARNm "maduro". Una vez completadas las modificaciones postranscripcionales, el producto terminal es el ARN "maduro", o ARN mensajero, exportado al citoplasma a través de los poros de la membrana nuclear.

La molécula de ARNm "maduro" está formada por el "capuchón" de 7-metil-GTP en el extremo 5', seguido por una secuencia no codificante, usualmente de unas 100 bases de extensión, hasta llegar al codón de iniciación, que siempre es AUG, triplete correspondiente a metionina. A continuación sigue la porción codificante en la cual la sucesión de codones indica la secuencia de aminoácidos en la proteína a sintetizar; esta porción concluye con un codón de terminación (UAA, UAG o UGA). Después se extiende un segmento de longitud variable (*trailer*). Finalmente, en la mayoría de los ARNm se encuentra la "cola" de poli A, de unas 200 unidades de nucleótidos de adenina. Las dos últimas porciones no son traducibles.

El trozo que contiene la serie de tripletes que codifican un polipéptido completo, desde el codón de iniciación hasta el de terminación, es denominado *encuadre* o *marco de lectura abierto*.

En bacterias, los genes raramente presentan secuencias intercaladas o intrones. Además, en los procariotas es común la existencia de ARNm policistrónico, es decir, con información para sintetizar varias cadenas polipeptídicas (varios genes son transcriptos uno a continuación de otro en la misma molécula de ARNm). En eucariotas, el ARNm es siempre monocistrónico, codifica para una cadena polipeptídica.

Transcriptoma

El conocimiento del genoma humano ha tenido un efecto multiplicador. Se han abierto otros campos a explorar, por ejemplo identificar, dentro de esa enorme masa de información, las secuencias nucleotídicas que corresponden a genes funcionantes.

Uno de los procesos cruciales de la actividad génica es la transcripción, que resulta en la síntesis de ARN de los diversos tipos conocidos; la de ARNm es etapa obligada en la síntesis de proteínas.

En cada célula, en un momento dado, sólo se activa una pequeña proporción de los genes que codifican proteínas. La determinación de los ARNm existentes en la célula brinda una instantánea de la actividad de transcripción y ofrece datos con una proyección funcional que el conocimiento del genoma *per se* no puede dar.

El conjunto de ARN contenido en una célula, tejido u órgano, ha sido llamado *transcriptoma* y el capítulo de la biología molecular a él referido es la *transcriptómica*.

Existe una notable diferencia entre especies respecto a utilización del genoma. Por ejemplo, casi todo el genoma de la levadura unicelular codifica proteínas, mientras en el de mamíferos, sólo el 2% lo hace. Esto indicaría que el transcriptoma no codificante de proteínas debe tener alguna relación con la mayor complejidad de los eucariotas superiores.

Aunque todas las células de un organismo tienen el mismo ADN, el transcriptoma varía de un tipo celular a otro y en distintos momentos en una misma célula, influido por distintos factores, como hormonas y otros agentes. Desde el punto de vista médico, interesa el estudio de las alteraciones del transcriptoma en diferentes condiciones patológicas.

Uno de los métodos más resolutivos en la caracterización de los ARN existentes en una muestra de tejido es el de *microarrays* (ver más adelante).

ARN ribosomal (ARNr)

Asociado a proteínas, este tipo de ácido ribonucleico integra los ribosomas, partículas celulares vinculadas a la síntesis de proteínas. Bacterias como *Escherichia coli* contienen unos 20.000 ribosomas. Las células de mamíferos tienen alrededor de diez millones de partículas ribosomales. A fin de atender la gran demanda de moléculas de ARNr en la célula, existen múltiples repeticiones de los genes que codifican para ARNr.

La síntesis de los ARNr mayores (28S, 18S y 5,8S) es catalizada por ARN polimerasa I en el nucléolo, donde se forma un trozo precursor de 45S que contiene los tres ARNr. Estos son liberados por ruptura del ARNr primario. A veces se encuentran segmentos intercalados o intrones. Por lo tanto, se requiere un procesamiento semejante al descripto para el mensajero.

El ARNr 5S es ensamblado fuera del nucléolo, por acción de ARN polimerasa III.

El ARNr "maduro" se une a proteínas para constituir las subunidades de los ribosomas (fig. 6-21). Cuando las dos porciones se unen para formar la partícula ribosomal completa, queda entre ellas una hendidura por la cual se desliza el ARNm durante el proceso de síntesis de proteínas. La función del ribosoma es la de servir de soporte a los diferentes componentes del sistema involucrado en la síntesis.

En el ribosoma se reconocen dos sitios adyacentes, denominados A (de aminoacil) y P (de peptidil), a los cuales se unen las moléculas de ARNt cargadas con aminoácido. En bacterias hay un tercer sitio, E (del inglés *exit*, salida).

ARN de transferencia (ARNt)

Su síntesis es catalizada por ARN polimerasa III en el núcleo. El ARNt precursor debe ser procesado para eliminar un intrón y modificar bases.

Este tipo de ARN, también llamado soluble, es encargado de unirse a aminoácidos libres en el citosol y transportarlos hacia el lugar de su ensamble en cadenas de nuevas proteínas. Existen ARNt específicos para cada aminoácido.

Su extremo 3' se une al aminoácido y es idéntico para todos los ARNt; la secuencia terminal es siempre CCA. La especificidad radica en otro sector de la molécula. En el asa central (figs. 6-19 y 6-20) se encuentra un triplete *anticodón*, complementario del codón correspondiente al aminoácido transportado por el ARNt. Por ejemplo, el ARNt para tirosina posee, en un segmento del asa central, el triplete GUA, anticodón de tirosina (codón UAC). El ARNt para alanina tiene el anticodón GGC (codón de alanina, GCC) y así para otros ARNt (el apareamiento codón-anticodón es antiparalelo y la secuencia siempre se lee en sentido 5'→3').

El ARNt actúa como una molécula intermediaria o adaptadora que reconoce una secuencia determinada de nucleótidos en el ARNm (codón) y permite ubicar en su sitio al aminoácido correspondiente.

Debido a la redundancia del código (la mayoría de los aminoácidos son especificados por más de un codón) puede existir más de un ARNt para algunos aminoácidos. De los 64 codones posibles, 61 codifican para aminoácidos (3 son señales de terminación). En la bacteria *Escherichia coli* se han encontrado alrededor de 40 ARNt diferentes que actúan como aceptores de aminoácidos. En consecuencia, algunos ARNt deben reconocer más de un codón en el ARNm, siempre que codifiquen para el mismo aminoácido. El enfrentamiento de la tercera base del codón con la primera del anticodón suele ser menos estricto que el de las otras dos, lo cual explica la posibilidad de apareamiento de un ARNt con más de un triplete. Como se verá más adelante, en los casos en los cuales la complementariedad del anticodón no es rigurosa, el ARNt no logra un encastre perfecto; realiza algo así como un bamboleo (*wobble*) sobre el codón.

Enzimas ribonucleicas o ribozimas

La afirmación "todas las enzimas son proteínas" constituyó casi un dogma de la bioquímica desde el descubrimiento de la naturaleza proteica de la ureasa por Sumner. Por ello resultó sorprendente la comprobación de la capacidad catalítica de algunas moléculas de ARN. En diversos organismos existen ácidos ribonucleicos que se comportan como enzimas, con todas las propiedades de catalizadores biológicos; se los llama *ribozimas*.

De acuerdo con su función, las ribozimas pueden ser hidrolíticas o participar en el proceso de *splicing*. Están compuestas por 40 a 200 nucleótidos, presentan diversas estructuras secundarias y plegamientos que resultan en distintas conformaciones tridimensionales.

Las hidrolíticas tienen capacidad para escindir enlaces fosfodiéster entre nucleótidos en cadenas de ARN. Algunas son autocatalíticas, es decir, catalizan su propia ruptura; otras como la ARNasa P actúan como endonucleasas en el procesamiento de precursores de ARNt.

En la mayoría de los casos, las ribozimas de *splicing* catalizan sucesivamente el corte de intrones que determina su separación de la cadena, y el empalme de los exones adyacentes. El propio intrón está comprometido en la acción enzimática; se trata aquí también de autocatálisis.

Hay otras funciones en las cuales están comprometidas ribozimas. La formación de uniones peptídicas en la síntesis de cadenas de proteínas es catalizada por *peptidil transferasa*, una ribozima localizada en la partícula mayor de los ribosomas. Algunas observaciones indican la participación de moléculas de ARN en las reacciones catalizadas por aminoacil-ARNt sintetasa (ver sección siguiente).

El descubrimiento de ARN catalítico, sumado a otras evidencias, alentó especulaciones sobre la posible significación de esta molécula en el contexto evolutivo.

Se han adelantado hipótesis proponiendo que, en el curso de la evolución, el ARN apareció antes que el ADN y las proteínas, desempeñando funciones que actualmente reconocemos a estos compuestos.

En efecto, el ARN puede contener información codificada en la secuencia de sus bases y duplicar-

se por mecanismos similares a los del ADN. Por otro lado, el ARN forma estructuras secundarias y se pliega en diversas conformaciones que en cierta manera semejan a las de las proteínas.

En algún momento del desarrollo de la vida en la Tierra, según diversos autores hace unos 4 mil millones de años, el ARN habría sido la molécula fundamental sobre la cual asentaban las funciones básicas que hacen posible la existencia de seres vivientes. Se habla de un "mundo de ARN".

La posterior aparición de proteínas y ADN ofreció nuevas estructuras, más aptas para ciertas misiones. Las proteínas exhiben mayor diversidad química y conformacional y son más dúctiles y eficientes que el ARN para actuar como catalizadores. Como material genético, el ADN tiene ventajas sobre el ARN, gracias a su mayor estabilidad química.

Durante la evolución de los seres vivos, la selección natural habría favorecido el reemplazo del ARN por ADN y proteínas en actividades para las cuales estas dos últimas moléculas tienen mayor aptitud.

El ARN se comporta muy bien como intermediario en los procesos de lectura y traducción de la información genética y continúa actuando en esas funciones.

MECANISMO DE LA BIOSÍNTESIS DE PROTEÍNAS

En suma, el proceso consiste en la *traducción* del mensaje contenido en el ARNm y el ensamble de aminoácidos en el orden por él indicado. En la síntesis de proteínas participan tres tipos de ARN (mensajero, ribosomal y de transferencia) y un conjunto de proteínas.

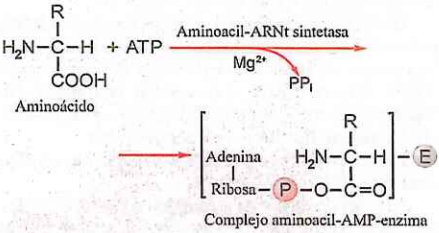
El ARNm es recorrido, codón a codón, por las partículas ribosomales que permiten la inserción de los ARNt sobre los tripletes complementarios de sus respectivos anticodones. Los aminoácidos transportados por los ARNt se unen en el orden señalado por la secuencia de tripletes en el ARNm, para formar la cadena polipeptídica. El ARNm es traducido en el sentido 5'→3' y la cadena polipeptídica es ensamblada desde su extremo N-terminal hacia el C-terminal. La incorporación de los aminoácidos en la secuencia exacta requiere su unión al ARNt específico y la correcta inserción de éste sobre la guía de ARNm por apareamiento codón-anticodón.

Cada vez que se sintetiza una proteína, las dos subunidades, mayor y menor, de los ribosomas se asocian entre sí y con el ARNm, para separarse cuando la cadena polipeptídica está terminada. A este proceso de asociación-disociación del ribosoma se lo llama *ciclo ribosomal*. Cada partícula ribosomal puede unirse a dos ARNt simultáneamente. Para ello posee dos sitios de fijación (en procariotas hay un tercero, E de *exit* o salida). Al sitio A se une el ARNt cargado con un aminoácido (aminoacil-ARNt), al P el que posee la cadena polipeptídica en formación (peptidil-ARNt). Finalmente el ARNt que queda libre después de transferir la hebra polipeptídica se desprende (desde el sitio E en los procariotas).

La biosíntesis comprende cuatro etapas principales: 1. *Activación de los aminoácidos*. 2. *Iniciación*. 3. *Elongación*. 4. *Terminación de la cadena polipeptídica*.

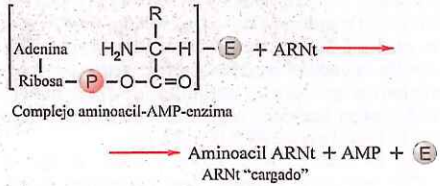
1. **Activación de los aminoácidos.** Esta etapa requiere aminoácidos libres, enzimas activantes llamadas *aminoacil-ARNt sintetasas*, ARNt, ATP y Mg^{2+}.

En una primera etapa, el aminoácido reacciona con ATP para formar un complejo aminoacil-AMP-enzima. Se libera PP_i, que es hidrolizado por pirofosfatasa.



Complejo aminoacil-AMP-enzima

La segunda etapa comprende la transferencia del aminoácido activado al extremo 3' del ARNt. La especificidad de la aminoacil-ARNt sintetasa le permite reconocer no sólo el aminoácido, sino también el ARNt correspondiente. Existen enzimas específicas para cada uno de los aminoácidos.



Complejo aminoacil-AMP-enzima

El complejo aminoacil-ARNt se dirige hacia el sitio de la síntesis, donde se reúnen los ARNt "cargados", el ARNm, los ribosomas y los factores que inician el ensamble de la cadena.

2. **Iniciación de la cadena polipeptídica.** El proceso es similar en procariotas y eucariotas, con algunas diferencias. En ambos la cadena comienza

con la inserción de formilmetionina en procariotas y de metionina en eucariotas, ambas indicadas por el codón AUG. En bacterias, una secuencia específica en el ARNm, llamada secuencia de Shine-Delgarno, precede al codón inicial y permite alinear al ARNm sobre el ribosoma (se aparea con un segmento complementario en el ARNr). Gracias a esto, los ribosomas bacterianos pueden empezar la traducción no sólo en el extremo 5' del ARNm, sino también en sitios internos de iniciación en los ARNm policistrónicos. En eucariotas, para la iniciación se reconoce el extremo 5' del ARNm por el *cap* de 7-metil-guanosina trifosfato; el codón inicial, en la mayoría de los casos, no siempre, es el primer AUG que aparece.

Factores de iniciación. Además del ribosoma, de un ARNt especial, llamado ARNt iniciador ($ARNt_i$), y del ARNm, la iniciación requiere un conjunto de proteínas llamadas *factores de iniciación*. En procariotas participan tres de estos factores, que se designan con las siglas FI y un número; en eucariotas existen al menos nueve factores, indicados con las letras FIe (en inglés eIF).

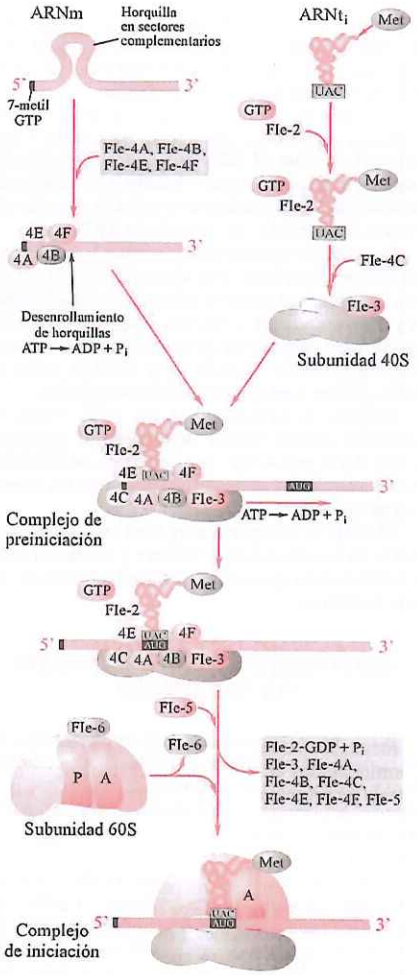
El ARNt iniciador fija metionina (met-$ARNt_i$) pero es diferente del ARNt de metionina que se inserta en codones AUG internos del ARNm. El $ARNt_i$ sólo se utiliza al comenzar la síntesis. En bacterias, la metionina del iniciador es formilada (N-formil-metionina), en eucariotas no.

La descripción siguiente corresponde al proceso en células de eucariotas.

Al comienzo las subunidades ribosomales deben estar separadas. Los factores disociantes son FIe-3 y FIe-6, que se unen a las subunidades 40S y 60S respectivamente.

a) Un complejo llamado FIe4F, que incluye las proteínas FIe4E, FIe4G, FIe4B y FIe4F, se une al *cap* del extremo 5' del ARNm. FIe4E es el que reconoce el *cap* y se fija a él; FIe4G se une también al extremo 3' poli A y mantiene próximos los terminales 5' y 3'; esta disposición facilita la regulación de la traducción. FIe4A, que se asocia a FIeF3, tiene actividad helicasa, desenrolla la cadena de ARNm en sectores complementarios que forman horquillas de doble hélice. Todas estas acciones requieren energía, provista por la hidrólisis de ATP (fig. 22-3).

b) El factor FIe-2, unido a GTP, se fija al ARNt iniciador cargado con metionina (met-$ARNt_i$). Este complejo ternario se dirige hacia una subunidad ribosomal 40S (unida a FIe-3). El conjunto subunidad 40S, FIe-3, FIe-4C, met-$ARNt_i$-FIe-2 se reúne en el extremo 5' del ARNm con su cortejo de factores. La subunidad ribosomal pequeña y el met-$ARNt_i$ quedan ubicados sobre la cadena de ARNm. Se ha formado



Fg. 22-3. Esquema del proceso de iniciación de la biosíntesis de una cadena polipeptídica en eucariotas.

el *complejo de preiniciación*. El FIe-1 integra este complejo y colabora en la búsqueda del codón inicial.

c) El complejo de preiniciación empieza a recorrer la hebra de ARNm en sentido 5'→3' hasta encontrar el primer codón AUG que esté flanqueado por una purina en la posición −3 y una G en +1; a este codón se aparea el anticodón del $ARNt_i$. La energía para el desplazamiento del complejo es suministrada por ATP.

d) El factor FIe-5, una GTPasa, hidroliza el GTP unido a FIe-2 y se liberan todos los factores asociados en el complejo, incluido FIe-2-GDP.

e) Una subunidad ribosomal 60S se desprende del FIe-6 y se asocia a la 40S, también libre de factores, para formar la partícula completa de 80S, que queda "enhebrada" en el ARNm que atraviesa la hendidura entre las dos subunidades. El met-ARNt$_i$ se adhiere al sitio P del ribosoma. Se ha formado el *complejo de iniciación* (fig. 22-3).

FIe-2 es un importante sitio de regulación de la traducción. Una de sus tres subunidades es modificada covalentemente por una proteína quinasa.

3. **Elongación.** En el complejo de iniciación, el met-ARNt$_i$ está ubicado en el sitio P del ribosoma, apareado con su anticodón al codón inicial en el ARNm. El sitio A, situado a la altura del codón siguiente, está vacío.

La adición de aminoácidos requiere además la participación de tres *factores de elongación*. En eucariotas los factores son designados FEe-α, FEe-βγ y FEe-2; sus equivalentes en procariotas son FE-Tu, FE-Ts y FE-G respectivamente.

La elongación se realiza a través de un ciclo que se repite con cada aminoácido agregado a la cadena en formación (fig. 22-4).

a) *Primer ciclo de elongación*. Un aminoacil-ARNt con anticodón complementario del triplete adyacente al ocupado por el met-ARNt$_i$ es conducido hacia el sitio A del ribosoma por el factor de elongación FEe-1α asociado a GTP. El aminoacil-ARNt sólo se fija al sitio A si el P está ocupado; de inmediato aparea su anticodón con el segundo codón en el ARNm. La energía requerida en esta etapa es provista por la hidrólisis del GTP del complejo. El FEe-1α, ahora unido a GDP, queda libre.

Como se ha indicado, para la mayoría de aminoácidos existen varios tripletes con el mismo significado (codones sinónimos). El número de ARNt distintos en las células es inferior al número de codones, lo cual implica que un ARNt es capaz de unirse a más de un codón, siempre que indiquen el mismo aminoácido. La tercera base del triplete es la menos específica y en muchos casos puede ser cambiada sin modificar el significado del codón. Esto es posible porque cuando el ARNt se fija por su anticodón al ARNm puede realizar cierto movimiento, algo así como un balanceo o bamboleo (en inglés *wobble*) y hace menos rigurosa la exigencia de complementariedad para la base ubicada en tercer lugar. Al parecer, este mecanismo favorece la rápida disociación entre el ARNt y el ARNm y da mayor velocidad al proceso de síntesis de proteínas. Otro factor que contribuye al apareamiento de un anticodón con diferentes codones es la con-

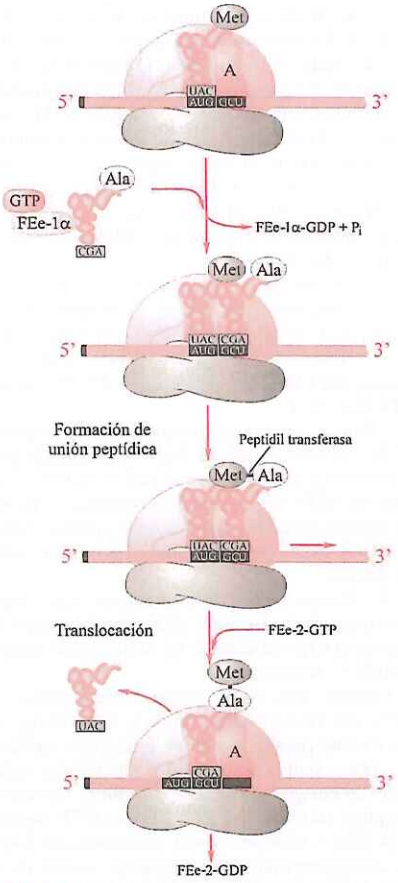
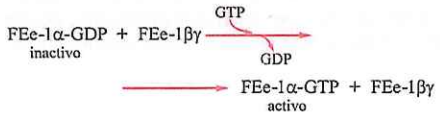


Fig. 22-4. Esquema del primer ciclo de elongación en la síntesis de una cadena polipeptídica.

versión de adenosina en inosina por desaminación. La inosina puede establecer interacciones con más bases que la adenosina.

El FEe-1α-GDP liberado es inactivo, incapaz de unirse a aminoacil-ARNt. La regeneración de la forma activa FEe-1α-GTP se realiza en el citosol por mediación de FEe-1βγ. Este factor estimula el cambio del GDP ligado a FEe-1α por GTP.



b) *Formación de la unión peptídica*. El grupo carboxilo de la metionina unida al ARNt$_i$ en la posición P forma un enlace peptídico con la función α-amina del aminoácido unido al ARNt en el sitio A. La reacción es catalizada por *peptidiltransferasa*, una ribozima localizada en la subunidad mayor del ribosoma. Se forma un dipeptidil que queda unido al ARNt ingresado en segundo lugar y ubicado en el sitio A. El ARNt$_i$ del sitio P, descargado de su metionina, es liberado. En procariotas, antes de ser expulsado, el ARNt$_i$ se desplaza al sitio E del ribosoma.

c) *Translocación*. Este término es un neologismo utilizado para indicar el desplazamiento del peptidil-ARNt desde el sitio A al P del ribosoma. La translocación requiere GTP y el factor de elongación FEe-2 (en procariotas, FE-G) unido a GTP (fig. 22-4).

Gracias al desplazamiento del peptidil-ARNt, el sitio A queda libre. La energía para la translocación es provista por la hidrólisis de GTP en GDP y P_i. Al mismo tiempo, el ribosoma avanza un codón más sobre el ARNm; frente al sitio A vacío queda situado el próximo codón del ARNm.

d) *Nuevos ciclos de elongación*. Las etapas descriptas para el primer ciclo de elongación se repiten en cada adición de un aminoácido al polipéptido en formación.

Cuando han transcurrido varios ciclos, el ARNt del sitio P tiene, unida a su extremo 3', una cadena peptídica que se inicia con metionina y posee tantos aminoácidos adicionales como pasos de elongación se han cumplido. Un nuevo complejo aminoacil-ARNt-FEe-lα-GTP ingresa en el sitio A siempre que el anticodón del ARNt sea complementario del siguiente codón en el ARNm. Se hidroliza el GTP, se libera FEe-lα-GDP. La peptidiltransferasa cataliza la formación de otra unión peptídica entre el carboxilo terminal del péptido unido al ARNt en el sitio P y el grupo amina del aminoacil recién ingresado con su ARNt en el sitio A; la cadena peptídica es transferida a éste. El ARNt del sitio P, ya descargado del péptido, es liberado. Ingresa FEe-2-GTP, que promueve la translocación del peptidil-ARNt desde el sitio A al P. Entonces se liberan FEe-2 y GDP y puede comenzar un nuevo ciclo (fig. 22-4).

El FEe-2 es el sitio de acción de la toxina producida por *Corynebacterium diphteriae*, agente de la difteria, enfermedad prácticamente erradicada por la vacunación. La toxina diftérica tiene acción letal; bloquea la síntesis de proteínas. Inserta adenosil-difosfatorribosa en el factor de elongación FEe-2 y lo inactiva. En esta reacción, llamada de *ADP-ribosilación*, se utiliza NAD como cofactor; éste pierde su porción nicotinamida y el resto adenosina difosfatorribosa es fijado al FEe-2 (ver pág. 478).

En el proceso de elongación, el ribosoma se desplaza sobre el ARNm en dirección 5'→ 3' y avanza un codón por ciclo. La cadena peptídica en formación crece un aminoácido por vez, desde el extremo amino terminal al carboxilo terminal.

El gasto energético para la formación de un enlace peptídico es de cuatro uniones fosfato de alta energía. La producción del aminoacilARNt requiere la hidrólisis de ATP a AMP; la unión inicial del aminoacil-ARNt al ribosoma consume un enlace de GTP y la translocación del peptidil-ARNt del sitio A al P exige otra hidrólisis GTP→GDP + P_i. Las moléculas de GTP y ATP consumidas en la formación del complejo de iniciación no se tienen en cuenta, pues resulta un gasto despreciable frente al costo total del ensamble de una proteína.

4. **Terminación de la cadena polipeptídica.** Completada la adición de todos los aminoácidos según el ordenamiento indicado por la secuencia de codones en el ARNm, el ARNt unido al sitio P posee, fijada a su extremo 3', la cadena polipeptídica completa. El marco de lectura abierto recorrido por el ribosoma está comprendido entre el codón AUG inicial y los de terminación. La señal de finalización es la presencia de un codón de terminación en el ARNm (UAA, UAG o UGA). Estos codones no son reconocidos por ARNt, sino por proteínas llamadas *factores de liberación*, que catalizan la hidrólisis de la unión entre la cadena polipeptídica y el ARNt. En procariotas existen tres factores de liberación (FL-1, FL-2 y FL-3), en eucariotas, uno (FLe), asociado a GTP.

El factor de liberación actúa en el sitio ribosomal A y requiere que el sitio P contenga el peptidil-ARNt. La cadena polipeptídica terminada es separada del ARNt y éste es expulsado del ribosoma, el cual a su vez se libera del ARNm. Si en el medio se encuentran FIe-3 y FIe-6, las subunidades 40S y 60S se disocian y pueden ser utilizadas para la síntesis de otra proteína (fig. 22-5).

La tabla 22-2 presenta los factores que participan en las distintas etapas de la síntesis.

Tabla 22-2. Factores de la síntesis de proteínas en eucariotas

Factor	*Función*
	Iniciación
FIe 1	Colabora en la búsqueda del codón iniciador.
FIe 2	Une el Met-ARNt$_i$ al ribosoma.
FIe 2A	Une el Met-ARNt$_i$ al ribosoma.
FIe 2B	Activa a IF2 por reemplazo GDP/GTP.
FIe 2C	Estabiliza el complejo.
FIe 3	Se une a la subunidad 40S e inhibe su reasociación con la 60S.
FIe 4A	Desenrolla la estructura secundaria de ARNm (actividad de helicasa).
FIe 4B	Asiste a FI 4ª.
FIe 4E	Reconoce el "*cap*" del ARNm y permite a la subunidad 40S unirse al extremo 5' del ARNm.
FIe 5	Promueve la hidrólisis de GTP y la liberación de los factores de iniciación.
FIe 6	Se une a la subunidad 60 S e impide su reasociación con la 40S.
	Elongación
FEe 1α	Une aminoacil-ARNt y GTP.
FEe 1$\beta\gamma$	Asiste en el intercambio de GTP y GDP en FEe 1α.
FEe 2	Transloca el ribosoma a lo largo del ARNm; hidroliza GTP. Es inhibido por ADP-ribosilación catalizada por toxina diftérica.
	Terminación
FLe	Promueve la hidrólisis de polipeptidil-ARNt para dejar libres la cadena polipeptídica y el ARNt. Une e hidroliza GTP.

Alteraciones genéticas que afectan la síntesis de proteínas producen diversos cuadros clínicos. Los cambios (mutaciones) en cada uno de los genes, tanto nucleares como mitocondriales, que codifican los múltiples factores que intervienen en este complejo proceso, causan trastornos en diversas funciones y órganos. Hasta el presente se han descripto muchos síndromes relacionados con esos defectos y el número sigue creciendo. No es posible aquí mencionar a todos ellos, solo citar que pueden deberse a deficiencias en los ribosomas, en los tRNA y en enzimas relacionadas con la activación de aminoácidos, en los factores que intervienen en la iniciación, elongación y terminación o en la regulación de las mismas. Es frecuente observar perturbaciones en los sistemas nervioso y muscular.

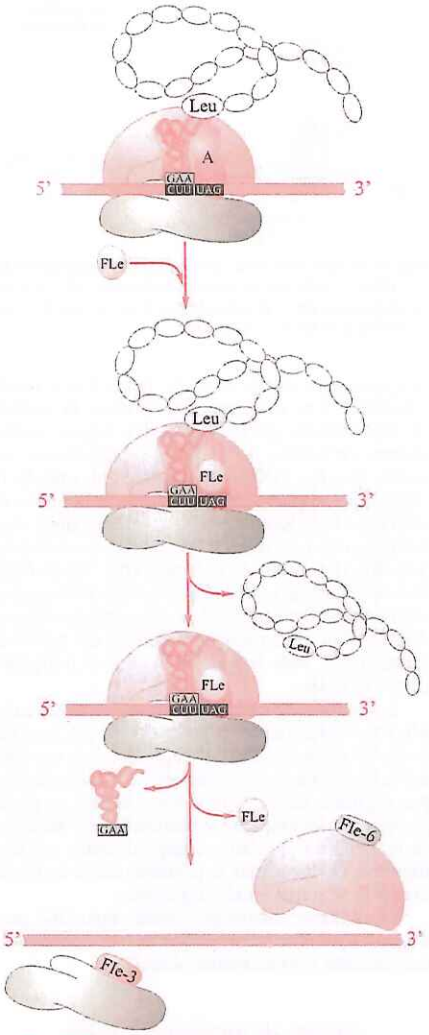


Fig. 22-5. Terminación de la cadena polipeptídica.

Polisomas. Una hebra de ARNm dirige simultáneamente la síntesis de varias moléculas de una misma proteína. El complejo de iniciación abarca unos 30 codones del ARNm molde en el comienzo de la cadena. Aproximadamente

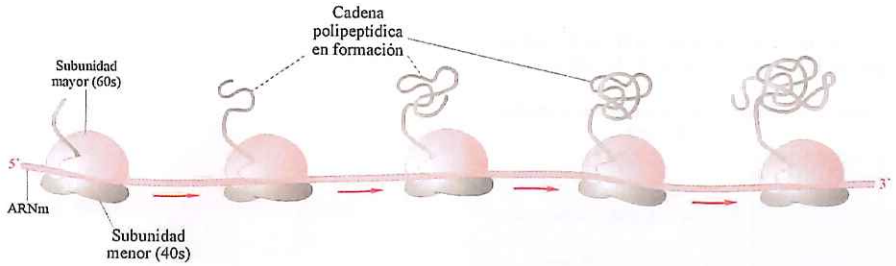


Fig. 22-6. Esquema de un polisoma. Cinco partículas ribosomales se desplazan desde el extremo 5' al 3' de una hebra de ARNm. Cada una de ellas se encuentra a distinto nivel del proceso de síntesis de la cadena polipeptídica, cuya estructura primaria está indicada por la secuencia de codones del ARNm. A medida que el ribosoma avanza, la proteína en formación crece en longitud.

después de recorrer unos 80 nucleótidos puede insertarse otro ribosoma para iniciar la síntesis de otra cadena polipeptídica. Un mismo marco abierto de lectura de longitud relativamente pequeña (por ej., 1.000 bases) puede unir más de 10 ribosomas, espaciados a lo largo de la hebra de ARNm; el conjunto aparece al microscopio electrónico con el aspecto de las cuentas de un rosario y recibe el nombre de *polisoma* (fig. 22-6). Cada uno de los ribosomas integrantes del polisoma se encuentra a distinto nivel de su recorrido sobre el ARNm. Mientras más próximo esté del punto de terminación, más larga será la cadena polipeptídica a él unida.

La síntesis de cadenas polipeptídicas se cumple más rápidamente en procariotas, que insertan hasta 20 aminoácidos por segundo. Los eucariotas lo hacen a una velocidad de 2 a 4 aminoácidos por segundo. Esta diferencia se explica, en parte, porque la transcripción y traducción en bacterias se realizan en el mismo compartimiento celular, mientras en eucariotas la primera ocurre en el núcleo y la segunda en el citoplasma.

Las células eucariotas tienen capacidad para degradar ARNm incompletos, o con codones de terminación erróneamente ubicados.

Acción de antibióticos sobre la síntesis de ADN y proteínas

Los antibióticos son sustancias producidas por microorganismos que tienen la propiedad de inhibir el desarrollo de otros microorganismos. Muchos de ellos ejercen su acción interfiriendo alguna de las etapas de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas y son ampliamente utilizados en medicina; además, han servido como valiosas herramientas en el estudio del proceso de síntesis de proteínas. Consideraremos algunos ejemplos.

Antibióticos que bloquean la replicación

Novobiocina. Producida por *Streptomyces*. Inhibe la unión de ATP a las topoisomerasas. No es usada en el tratamiento de infecciones humanas.

Ciprofloxacina. Es una fluoroquinolona. Bloquea la última etapa de la reacción de las topoisomerasas y el cierre de la ruptura de la hebra de ADN. Es un antibiótico de amplio espectro. Actúa sobre todas las topoisomerasas bacterianas y sólo en concentraciones muy superiores a las terapéuticas (varios órdenes de magnitud mayores) sobre las de eucariotas.

Antibióticos que bloquean la transcripción

Actinomicina D. Es una molécula constituida por un anillo fenoxazona unido a dos pentapéptidos cíclicos iguales. Bloquea la transcripción fijándose firmemente a la doble hélice del ADN, preferentemente en sitios con restos guanina. De esta manera, impide al ADN actuar como molde para la síntesis de ARN. El proceso de traducción no es inhibido primariamente por la actinomicina, de modo que la síntesis de proteína puede continuar, utilizando ARNm preexistente. Actúa tanto en organismos procariotas como eucariotas. Ha sido utilizado para controlar el crecimiento de tumores malignos, pero su uso clínico es muy limitado debido a su toxicidad. Se lo emplea con fines experimentales.

Rifamicina-rifampicina. La rifamicina es un antibiótico natural, producido por *Streptomyces*; la rifampicina es un derivado semisintético que

ejerce la misma acción. Ambos inhiben la transcripción bloqueando la iniciación de la síntesis de ARN. Actúan sobre la ARN polimerasa e impiden la formación del primer enlace fosfodiéster 5'→3' del ARN. No interfieren la síntesis de cadenas de ARN ya iniciadas. Las ARN polimerasas de procariotas son sensibles a estos antibióticos, no así las de eucariotas. La rifamicina puede inhibir la síntesis de ARN en mitocondrias humanas, pero para ello es necesario utilizar dosis mucho más altas que las empleadas para combatir infecciones bacterianas.

Antibióticos que bloquean la traducción

Puromicina. Actúa sobre células procariotas y eucariotas. Tiene una estructura similar a la del extremo 3' del aminoacil-ARNt portador de tirosina o fenilalanina. Por esta razón, puede ocupar el sitio A del ribosoma y unirse a la cadena polipeptídica en formación en la reacción catalizada por peptidiltransferasa. Su inserción en la cadena bloquea el ingreso del próximo aminoacil-ARNt. Como la unión de la puromicina al sitio A del ribosoma no es firme, la cadena formada hasta ese momento se desprende; la síntesis se interrumpe prematuramente. La investigación con puromicina permitió proponer la existencia de los sitios A y P en ribosomas.

Paromicina. Se une al sitio A donde interaccionan codón y anticodón del aminoacil-ARNt y disminuye la selectividad del apareamiento, lo que provoca errores de traducción.

Higromicina B. Efectivo en procariotas y eucariotas. Se fija al sitio A de la subunidad 30S e impide la translocación del peptidil-ARNt.

Estreptomicina. Es un aminoglicósido (trisacárido) que interfiere la iniciación de la traducción en procariotas. Perturba las interacciones del ARNt con el ribosoma y el ARNm. Se une a factores iniciadores y probablemente a ARNr 16S de la subunidad ribosomal 30S de bacterias. Actúa sobre esta subunidad pequeña, impide la unión de N-formilmetionil-ARNt y favorece la acumulación de complejos de iniciación anormales. Cuando la síntesis de la cadena polipeptídica ya está iniciada, la estreptomicina produce errores en la traducción. A concentraciones relativamente altas, inhibe la iniciación

Neomicina y gentamicina. Son aminoglicósidos que interactúan con la subunidad ribosomal pequeña en sitios distintos a los de unión de estreptomicina.

Tetraciclinas. Inhiben la síntesis de proteínas en procariotas uniéndose a la subunidad ribosomal pequeña (30S), lo cual bloquea la aproximación del aminoacil-ARNt al sitio A. Este efecto es reversible; cuando se suprime la administración del antibiótico, las bacterias reanudan su desarrollo. Ha sido utilizado como aditivo de alimentos balanceados para evitar infecciones en animales cuya carne es consumida por humanos. Por esta razón se ha producido gran exposición a las tetraciclinas y notable desarrollo de cepas de bacterias resistentes a estos antibióticos.

Cloranfenicol. Se fija a la subunidad ribosomal mayor (50S), e impide el proceso de elongación más allá de la primera unión peptídica bloqueando la transferencia de la cadena peptidilo; es un inhibidor de la peptidil transferasa. Afecta a procariotas y también puede bloquear la síntesis de proteínas en mitocondrias de eucariotas.

Eritromicina. Se une a la subunidad ribosomal 50S de bacterias cerca del lugar donde lo hace el cloranfenicol. Impide la translocación del peptidil-ARNt en el ribosoma desde el sitio A al P.

Cicloheximida. Bloquea la síntesis de proteínas en células de eucariotas pero no en la de procariotas. Su mecanismo de acción es similar al del cloranfenicol, es decir, inhibe la peptidil transferasa.

Kirromicina. Anula la función del factor de elongación FE-Tu evitando los cambios de conformación asociados a la hidrólisis de GTP. Cuando el antibiótico está unido al factor éste puede fijar aminoacil-ARNt al sitio A, pero el complejo FE-Tu-GDP no se libera del ribosoma y no se forma la unión peptídica. Como resultado, el ribosoma queda "atascado" en el ARNm y detiene la síntesis de la proteína.

Ácido fusídico. Es un antibiótico esteroideo que frena al ribosoma en la etapa posterior a la translocación. Se fija al FE-G e inhibe el cambio conformacional que ocurre después de la hidrólisis de GTP. Estabiliza el complejo ribosoma-FE-G-GDP, de modo que el FE-G-GDP no se libera. El ribosoma no puede unir un nuevo aminoacil-ARNt y la síntesis se bloquea. El ácido fusídico actúa tanto en bacterias como en eucariotas.

MUTACIONES GENÉTICAS

En sentido amplio, se llama *mutación* a cualquier cambio en la secuencia del ADN. Según la extensión que abarque ese cambio, se consideran: a) mutación puntual; afecta solamente a un par de bases; b) cambios estructurales de los cromosomas; comprenden tramos más extensos de la molécula de ADN.

a) **Mutaciones puntuales.** Consisten en el reemplazo de una base por otra o la adición o pérdida de un par de bases.

La sustitución de una base se llama *transición* cuando se cambia una base púrica o una pirimídica por otra del mismo tipo. Se denomina *transversión* al cambio de una purina por una pirimidina o viceversa.

El reemplazo de una base por otra en un codón puede producir un cambio en el significado del triplete afectado. Por ejemplo, si en el codón de ácido aspártico (GAU) se reemplaza la adenina por guanina, resulta el triplete que indica glicina (GGU).

Debido a la redundancia del código, no siempre estas mutaciones se traducen en alteraciones del mensaje. Frecuentemente se puede cambiar la tercera base del codón sin modificar su significado; en este caso la mutación es llamada "silenciosa". Por otra parte, aun cuando se produzca un cambio en el codón capaz de determinar sustitución de un aminoácido por otro en la proteína sintetizada, no siempre ello ocasiona trastornos funcionales. Para que esto ocurra, el reemplazo debe provocar alteraciones conformacionales, pérdida de grupos funcionales críticos o interesar sectores "clave" de la molécula (sitio activo de enzimas, por ejemplo).

Las mutaciones que no ocasionan alteraciones funcionales en la proteína codificada se llaman *neutras*.

La hemoglobina S (pág. 57) es una proteína anormal resultante de una mutación puntual (transversión) en el gen que codifica para la cadena β de la globina. Una adenina es sustituida por timina en la hebra codificante del ADN, lo cual produce un cambio del codón de glutámico (GAA) por el de valina (GUA) en el ARNm. En este caso, el cambio de un solo aminoácido en la proteína provoca una alteración funcional de tal magnitud que los individuos homocigotas para el gen anormal no sobreviven. Este tipo de mutaciones es designado de *sentido erróneo* (*missense* en inglés).

También son mutaciones puntuales las debidas a adición o pérdida de un par de bases en la molécula de ADN. Este tipo de mutación suele producir alteraciones muy graves, ya que modifica completamente el mensaje genético a partir de la base afectada. Como el código está relacionado con la secuencia de codones de tres bases consecutivas cada uno y es traducido ordenadamente en sentido 5'→3', si en un sitio cualquiera de la cadena se elimina o se añade una base, los tripletes siguientes resultan modificados y, por ende, el mensaje genético sufre una perturbación total. Se produce un desfase o "corrimiento" de la pauta, *encuadre* o *marco de lectura*. El agregado o pérdida de una base crea un nuevo marco de lectura, con codones diferentes. La secuencia de aminoácidos estará completamente alterada desde el sitio de la mutación y es muy probable que la proteína resulte funcionalmente inútil.

Si, como consecuencia de un cambio de base en un codón, o de un desplazamiento producido por adición o sustracción de bases, se forma un triplete de terminación, se interrumpe en ese punto la síntesis y se libera la cadena polipeptídica antes de completar su formación. Este tipo de mutación, llamada *sin sentido* (*non sense*), "aborta" la síntesis de la proteína, con liberación de cadenas polipeptídicas incompletas o truncadas.

En los ejemplos siguientes puede apreciarse la modificación en la secuencia de aminoácidos provocada por la eliminación o adición de una base.

Se indica a continuación un trozo de ARN mensajero que abarca nueve codones y la sucesión de aminoácidos que el segmento codifica:

...-GUC-ACG-CUA-UGG-AUG-CAC-GCU-UAC-CGU-...
- Val - Thr - Leu - Trp - Met - His - Ala - Tyr - Arg -

Si se elimina la adenina del segundo codón, el mensaje corresponderá a una secuencia de aminoácidos muy distinta:

...-GUC-A CGC-UAU-GGA-UGC-ACG-CUU-ACC-GU...-
- Val - Arg - Ile - Gly - Cys - Thr - Leu - Thr - Val -

Si se agrega adenina entre los codones primero y segundo, se tiene la siguiente modificación del mensaje:

...-GUC-AAC-GCU-AUG-GAU-GCA-CGC-UUA-CCG-U...-
- Val - Asp - Ala - Met - Asp - Ala - Arg - Leu - Pro -

b) **Cambios estructurales en los cromosomas.** Afectan una porción más o menos amplia del cromosoma y alteran el orden lineal de su molécula de ADN. Dentro de este tipo de mutaciones se consideran: 1. *Deleción*: pérdida de un segmento de ADN. 2. *Duplicación*: repetición de un trozo de ADN. 3. *Inversión*: cambio de sentido de un tramo dentro de la misma molécula de ADN. 4. *Translocación*: un fragmento de una molécula de ADN cambia de posición relativa dentro del mismo cromosoma o se incorpora en otro. Algunas de estas alteraciones pueden resultar en ausencia, y otras en exceso de la/s proteína/s codificada por el o los genes afectados.

Mutaciones somáticas y germinales. Las mutaciones ocurren al azar en cualquier sitio del genoma y en cualquier célula de un organismo. Las que afectan células somáticas se transmiten a las células originadas a partir de la mutante a través de sus sucesivas divisiones. Si la mutación da lugar a alteraciones, éstas se manifiestan sólo en el

tejido al cual pertenecen esas células. Cuando la reproducción se hace por cruzamiento sexual, la mutación desaparece con la muerte del organismo.

En cambio, las mutaciones en células germinales se transmiten al nuevo ser que esas células afectadas pueden generar y así se perpetúan. Estas mutaciones originan variabilidad genética en las poblaciones. Las formas alternativas de un mismo gen se denominan *alelos*. En los organismos diploides los descendientes reciben, para los genes que ocupan el mismo locus en un par de cromosomas homólogos, un alelo materno y otro paterno. Si ambos son diferentes, el nuevo individuo será *heterocigota* para ese carácter; si recibe alelos iguales, será *homocigota*.

Frecuencia de las mutaciones. En cualquier organismo se producen mutaciones, ya sea por errores del sistema de síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, o por factores ambientales. Gracias a la perfección de la síntesis y a la capacidad de los mecanismos de corrección, en condiciones normales la incidencia de mutaciones es muy baja. Se habla de un nivel basal de mutaciones *espontáneas*. En bacterias se ha determinado que la frecuencia de mutaciones productoras de alteraciones detectables en el funcionamiento de los genes es de alrededor de 10^{-6} por locus y por generación. No existen estimaciones precisas de la tasa de mutación en eucariotas; pero probablemente es menor que la de bacterias.

Dicha frecuencia basal puede ser aumentada por factores que actúan directamente sobre el ADN produciendo modificaciones. A estas mutaciones se las llama inducidas, y a los factores responsables, *mutágenos*. La efectividad de un agente mutagénico se mide por el incremento que provoca en el nivel basal de mutaciones.

Agentes mutagénicos. Numerosos agentes físicos y químicos actúan como mutágenos. Entre los físicos tienen notable efecto radiaciones de mayor energía y de menor longitud de onda que las de luz visible. Se pueden considerar las radiaciones ionizantes (rayos X, radiaciones α, β y γ, emitidas por isótopos radiactivos y rayos cósmicos) y las no ionizantes (luz ultravioleta).

Las *radiaciones ionizantes* tienen gran poder de penetración en los tejidos. Al chocar con átomos de las moléculas constituyentes de esos tejidos producen liberación de electrones y formación de iones o de radicales libres. La luz ultravioleta tiene poco poder de penetración, razón por la cual afecta principalmente tejidos superficiales (piel). En general, su energía no es lo suficientemente intensa como para producir ionización, pero puede promover electrones a niveles de energía más elevados y obtener un estado de "excitación" en el átomo alcanzado. Las moléculas con grupos ionizados o "excitados" son más reactivas químicamente. A la mayor reactividad de la molécula de ADN se deben los efectos mutagénicos de las radiaciones.

Los mutágenos químicos comprenden gran variedad de compuestos que actúan por distintos mecanismos. Algunos lo hacen modificando directamente las bases en el ADN, ya sea por introducción de restos alquilo (por ejemplo, el gas mostaza utilizado con fines bélicos) o por desaminación (ácido nitroso); otros por reemplazo de una base nitrogenada (análogos de bases como 5-bromuracilo y 2-aminopurina), o por inserción entre los pares de bases apiladas en el interior de la doble hélice (acridinas). Productos de la combustión del tabaco y muchísimos otros compuestos, especialmente de carácter aromático, son mutagénicos.

Se ha encontrado una correlación directa entre la capacidad mutagénica de un agente y su eficacia para inducir degeneración maligna de las células, es decir, para producir cáncer.

Experimentalmente es posible introducir cambios en la secuencia de un gen en sitios específicamente seleccionados a fin de estudiar los efectos de la modificación (*mutagénesis dirigida*).

El desarrollo tecnológico, que en muchos aspectos ha mejorado las condiciones de vida en la Tierra, en otros casos ha contribuido al deterioro del ambiente. Es necesario controlar rigurosamente toda posibilidad de emisión al medio de radiaciones y de agentes químicos mutagénicos. Debe estudiarse exhaustivamente la mutagenicidad de los productos que se introducen en el mercado de consumo. Es necesario reconocer el peligro y procurar por todos los medios revertir el proceso de contaminación que soporta nuestro hábitat.

Transposones

La secuencia de bases puede ser también alterada por inserción de segmentos de ADN con capacidad para "saltar" o moverse de un lugar a otro del genoma, ya sea dentro de un mismo cromosoma, entre cromosomas diferentes, o bien hacia ADN extracromosómico (por ej., plásmidos en bacterias). Estos elementos génicos reciben el nombre de *transposones*.

La existencia de genes móviles había sido sugerida hace muchos años, pero sólo recientemente se identificaron transposones en bacterias. Los más simples, designados *secuencias de inserción* (SI), son porciones de ADN portadoras de la información necesaria para sintetizar las

enzimas que catalizan su propia transposición. Estas unidades están flanqueadas por secuencias cortas, iguales a ambos lados, aunque invertidas en su ordenamiento (en inglés *inverted repeats*). En algunos casos, al separarse de su sitio inicial dos secuencias SI próximas, arrastran la porción del genoma ubicada entre ellas y, por ejemplo, permite a genes que confieren resistencia a distintos antibióticos y antisépticos mercuriales acumularse en un plásmido. Los elementos móviles se transfieren de un plásmido a otro y éstos de una bacteria a otra, aun entre especies diferentes.

La presencia de transposones ha sido detectada no sólo en bacterias, sino también en el genoma de diferentes especies vegetales y animales, incluida la humana.

El mecanismo general mediante el cual se realiza la transposición es el siguiente: en el sitio receptor se seccionan las dos hebras del ADN a distintos niveles, creando extremos con un cabo más largo que otro, semejantes a los formados por algunas endonucleasas de restricción. El transposón se introduce en la brecha producida por el corte y cada uno de sus extremos establece una unión fosfodiéster 5'→3'con el cabo de monohebra más largo. A ambos lados queda una porción de cadena única, correspondiente a esos cabos, y es necesario sintetizar el segmento complementario faltante para restituir la doble hélice en los dos flancos del transposón. De este modo se originan dos trozos de idéntica secuencia, repetidas en la misma dirección (en inglés *direct repeats*), que se encuentran siempre en los sitios donde ocurrió una inserción.

Se distinguen varios tipos de transposición. Cuando el elemento abandona el lugar que ocupaba y se aloja en un nuevo sitio receptor, recibe el nombre de *transposición conservadora*. En otros casos, descritos en bacterias, el transposón sufre primero una replicación; una de las copias permanece en el sitio original y la otra es insertada en otro lugar receptor. A ésta se la llama *transposición replicadora*. Un tercer tipo consiste en la introducción, en la doble hélice, de secuencias de ADN producidas por transcripción inversa a partir de ARN. Estos elementos son denominados *retroposones*. Los mejor conocidos son los que introducen en el genoma, tanto de bacterias como de eucariotas, la información genética de los llamados *retrovirus*.

El genoma de mamíferos contiene gran número de secuencias repetidas. Parte importante de éstas son retroposones. Se distinguen dos clases de este tipo de retroposones, designadas LINE (del inglés *long interspersed nucleotide element*) y SINE (*short interspersed nucleotide element*). LINE corresponde a secuencias largas (~6,5 kb) de las cuales existen hasta 50.000 copias. SINE son secuencias cortas; las más abundantes en humanos pertenecen a la familia *Alu* que constituye gran parte del ADN moderadamente repetitivo; son segmentos de ~300 pares de bases con más de 300.000 copias en el genoma haploide, intercalados con ADN no repetitivo. Se las llama *Alu* porque son seccionadas por la enzima de restricción *Alu I*. Los genes que codifican para algunos ARN nucleares pequeños también se habrían originado como retroposones.

Las posibilidades de transposición de un elemento móvil no son ilimitadas. Se conocen diferentes mecanismos moleculares que restringen el número total de copias a insertarse en el ADN receptor.

En procariotas, cuando un gen móvil se introduce entre un promotor y los genes estructurales, o dentro de un operón policistrónico, puede inhibir la transcripción del mensaje "corriente abajo" del transposón. Actuaría así como regulador de la expresión de otros genes. En eucariotas, la inserción de un transposón puede activar o reprimir genes ubicados en las proximidades, o bien favorecer la producción de alteraciones estructurales. De este modo, la transposición adquiere importancia como fenómeno capaz de introducir modificaciones en el genoma y, por ende, como factor determinante de cambios evolutivos en los seres vivos.

Varioma

Se conoce el genoma completo de un número cada vez mayor de especies animales y vegetales. Aparte de la enorme importancia que este conocimiento tiene en diferentes áreas de la biología, a la concreción del Proyecto Genoma Humano se le deben asignar logros adicionales, como el de estimular otros emprendimientos, no menos ambiciosos y promisorios, tendientes a brindar un panorama más dinámico o funcional del material genético.

Así, al genoma siguieron el transcriptoma, el proteoma, el metaboloma, que se consideran en otras secciones de este texto.

Hace pocos años se ha iniciado otro proyecto, el del *varioma humano*, que refiere a la variabilidad debida a mutaciones en el genoma de la especie *Homo sapiens*.

Como se ha mencionado, no todas las mutaciones son deletéreas, muchas no ocasionan cambio funcional alguno. Desde el punto de vista

médico, interesan aquéllas que comprenden a genes, o a regiones no codificantes con funciones regulatorias, que producen alteraciones causantes de cuadros patológicos.

El Proyecto Varioma Humano se propone registrar, a nivel mundial, todas las mutaciones responsables de enfermedades para formar un gran banco de datos de libre acceso. Ello facilitará la detección de esas anomalías.

Transgénesis

El término transgénesis se refiere al proceso de introducción de un gen exógeno o modificado (*transgén*) en un organismo de la misma especie de la cual procede el gen o de otra diferente, de modo que se incorpore al genoma del receptor y lo transmita a su descendencia. La ingeniería genética ha hecho posible, mediante este proceso, la producción de vegetales o animales genéticamente modificados, conocidos como *transgénicos*. Debido a su rápida reproducción, facilidad de mantenimiento y simpleza de su genoma, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* es un organismo utilizado con gran éxitoen transgenesis. El método se ha extendido a vertebrados; el ratón constituye una de las especies empleadas con más frecuencia. Los avances recientes en el secuenciamiento del genoma contribuyen a acelerar y extender la producción de transgénicos a otras especies.

La manipulación génica en animales puede consistir en la inserción de un gen nuevo, o uno previamente existente. En este último caso, la expresión total superará los niveles basales del organismo aceptor.

Por otra parte, se puede anular la expresión de un gen, o modificar su estructura para inactivarlo. Esto da como resultado lo que se conoce en inglés como animales *knock out*. También se puede suprimir la expresión de un gen dado reemplazándolo por otro, para producir los denominados animales *knock in*. El fenotipo que resulta de la pérdida o ganancia de función de un gen permite conocer su papel fisiológico.

La alteración de un gen puede afectar muchos tejidos si ese gen se expresa de manera inespecífica en todo el organismo , o incluso puede ser letal para el embrión; en ambos casos no es posible la caracterización funcional del gen. Para evitar este problema, se puede limitar la modificación génica a un tejido en particular, o diferir la expresión del gen a estadios más tardíos de maduración. Esto se logra introduciendo el gen de interés en sitios específicos del ADN, controlados por promotores y factores de transcripción definidos. Además se pueden agregar elementos a nivel del promotor que permitan controlar la expresión del transgén. Esta regulación temporal del gen incorporado resulta en lo que se conoce como *animales transgénicos inducibles* o *condicionales*.

Además de servir para el estudio de la función de un gen, los animales transgénicos son útiles para determinar la actividad de regiones promotoras en el ADN. Para esto se introducen, en sitios controlados por el promotor que se desea estudiar, genes conocidos cuya expresión se puede detectar fácilmente por su fluorescencia intrínseca o por sus propiedades bioquímicas (en inglés, *reporter genes*). Esto permite estudiar la regulación de un gen en diferentes tejidos o durante el desarrollo del organismo.

La metodología para generar animales transgénicos incluye distintos procedimientos a fin de lograr la recombinación del ADN foráneo con el genoma del organismo huésped. La recombinación se puede realizar de manera azarosa, o de forma dirigida por homología entre regiones del ADN introducido y el genoma aceptor. El ADN exógeno se introduce en el pronúcleo de óvulos fertilizados, por microinyección directa, o utilizando virus que actúan como vectores. Luego los óvulos se implantan en el útero de animales receptivos. De esta manera, el ADN incorporado al genoma se propaga en las divisiones celulares sucesivas, para finalmente expresarse en el animal desarrollado. Otro procedimiento consiste en utilizar células madre embrionarias provenientes de blastocistos (conocidas en inglés como *stem cells*). A estas células pluripotentes primeramente se les incorpora el ADN predeterminado mediante transfección en cultivo. Luego, las células se inyectan en blastocistos, en los cuales se dividen y diferencian constituyendo parte del futuro embrión. El animal que se obtiene, o quimera, expresa el gen determinado y si el nuevo genotipo se incorpora a las células germinales, será transmitido a la descendencia, lográndose una línea transgénica. Normalmente se requiere una serie de cruzamientos para obtener animales homocigotas para el transgén deseado. Los métodos mencionados se utilizan frecuentemente en la producción de ratones transgénicos. En otras especies se han empleado procedimientos diferentes, como por ejemplo la transferencia de genes mediada por espermatozoides, en donde genes determinados se introducen primero en gametas masculinas y éstas se usan para inseminación de óvulos que contendrán y producirán embriones con el nuevo ADN. Otra técnica es la de transferencia nuclear, que consiste en el reemplazo del

núcleo de óvulos por el de una célula somática que ha sido previamente manipulada genéticamente, lo que produce animales transgénicos por clonación de un genoma modificado.

La utilización de animales transgénicos ha significado uno de los grandes logros de la biología molecular. Permite: a) estudiar la función de un gen determinado y su regulación en el animal entero, b) reproducir en animales enfermedades genéticas del ser humano, creando así modelos experimentales para el estudio de esas patologías, c) obtener en animales la síntesis de proteínas humanas, por ejemplo hormonas, utilizables con fines terapéuticos y d) introducir cambios que mejoren la calidad y cantidad de los productos de origen animal para consumo humano.

Micromatrices o "microarrays" de ADN

El *microarray* de ADN es una técnica que permite detectar los genes que se expresan en un momento dado en una muestra de células o tejido. En algunas publicaciones se traduce *microarrays* como *micromatrices* (*array*: ordenamiento, serie ordenada).

El procedimiento comprende las siguientes etapas:

1. Sobre una superficie sólida (placa o *chip*) del tipo de un portaobjetos de vidrio u otro material adecuado se disponen, ordenadas en grilla o "tablero de ajedrez", distintas monohebras de ADN representativas de genes o segmentos de genes. Cada tipo de ADN, conteniendo miles a millones de copias, es fijado en un sitio definido e identificable de la grilla. Una placa puede alojar de miles a decenas de miles de sitios, correspondientes a otros tantos genes.

2. La muestra a analizar se prepara a partir de ARNm extraído de las células o tejido en estudio. El ARNm representa a los genes transcriptos o transcriptoma en el momento de la toma de material. Por transcripción invertida se sintetiza ADN de hebras complementarias con las del ARNm. Los trozos de ADN obtenidos, designados con las siglas ADNc, son copia de toda la información genética que está siendo expresada. Las cadenas de ADNc son "rotuladas" por adición de un marcador. A estos fines se utiliza comúnmente un compuesto fluorescente.

3. Una suspensión del ADNc "marcado" se vierte sobre la placa del *microarray* hasta cubrirla. Los trozos de ADNc en la preparación se unirán específicamente al ADN de los sitios donde se encuentren hebras complementarias.

4. La placa se lleva a un dispositivo de detección que hace visibles, con la coloración correspondiente al marcador fluorescente, los sitios donde se han formado dobles hélices. Un programa de computación produce un patrón en el cual se distinguen, como puntos coloreados, todos esos sitios, al tiempo que realiza su lectura e identifica los genes correspondientes. Incluso se puede tener una estimación cuantitativa, según la intensidad de la fluorescencia. Esta imagen de puntos coloreados puede mostrar, en una misma placa, la actividad de miles de genes.

El método tiene múltiples aplicaciones y brinda valiosa información para estudios muy diversos. Por ejemplo, determinación de actividad génica en distintas situaciones, comparación de tejidos sanos y enfermos, investigación de la naturaleza y evolución de neoplasias, efectos de fármacos y desarrollo de nuevos medicamentos, etc. En clínica puede utilizarse con fines de diagnóstico y pronóstico de enfermedades.

Proteoma

Los datos del proyecto genoma humano indican que el número total de genes en una célula es menor que la cantidad de proteínas que ella sintetiza. La información contenida en un gen puede servir para producir más de un polipéptido, gracias a mecanismos como el *splicing* alternativo, edición de ARNm, elección de diferentes sitios de poliadenilación, etc., que modifican el ARNm original. Por esto se ha planteado la necesidad de determinar y caracterizar todas las proteínas existentes en un individuo, lo cual implica un nuevo gran desafío.

El término *proteoma* fue propuesto para definir el total de proteínas producidas por un organismo, tejido o célula.

Mientras el genoma es prácticamente el mismo en todas las células de un individuo, el conjunto de proteínas sintetizadas difiere notablemente en distintos tipos celulares. En un momento dado, cada célula tiene una muy reducida porción de sus genes en actividad y expresa un repertorio de proteínas característico. Esta expresión puede variar en distintas etapas del desarrollo, en diferentes condiciones fisiológicas o patológicas, o en respuesta a cambios ambientales.

La caracterización de todas las proteínas en una célula, tejido u organismo constituye un nuevo campo de investigación, denominado *proteómica*.

El conocimiento del genoma ha promovido enormemente el interés por los estudios

proteómicos. La detección de "marcos de lectura abiertos" en el ADN permite predecir la secuencia de las proteínas que eventualmente pueden sintetizarse, pero no nos indica directamente los sectores del genoma transcriptos en un determinado momento. La investigación del ARNm presente o transcriptoma puede dar idea más aproximada de la actividad génica, pero no siempre se corresponde exactamente con las proteínas sintetizadas ya que, a partir de una misma información, se pueden elaborar distintos polipéptidos por los mecanismos antes mencionados. Además, las modificaciones postraducción son fuente de variación del patrón proteico, no detectable por los estudios genómicos ni transcriptómicos. El proteoma ofrece datos no reemplazables por los obtenidos con el análisis de ácidos nucleicos.

La proteómica comprende no sólo la identificación y determinación cuantitativa de las proteínas existentes en células, tejidos u organismos, sino también el estudio de su actividad biológica, localización subcelular, interacciones y formación de complejos multimoleculares.

La metodología básica utilizada inicialmente en proteómica fue la *electroforesis en gel de poliacrilamida a dos dimensiones*. Las proteínas de la muestra en estudio se separan primero según su carga eléctrica. Luego se hace pasar la corriente en dirección perpendicular a la de la operación anterior, en un medio que separa las proteínas contenidas en cada fracción según su tamaño molecular.

Esta técnica se potenció enormemente con la aplicación de la *espectrometría de masa* para analizar cada una de las fracciones obtenidas. Se pueden resolver así miles de proteínas y péptidos en líquidos biológicos.

La adquisición de nuevos métodos, el uso de marcadores fluorescentes (por ejemplo, proteína fluorescente verde) y sucesivos refinamientos técnicos van ofreciendo posibilidades de resolución cada vez mayores. Actualmente los laboratorios mejor equipados pueden identificar en un tejido más de 5.000 proteínas distintas de una vez.

Los *microarrays* también se han agregado al arsenal proteómico. Así como los *microarrays* de ADN son de gran utilidad para detectar la presencia de determinadas secuencias de nucleótidos en un material biológico, el desarrollo de micromatrices para identificar proteínas ofrece excelentes perspectivas de aumentar la sensibilidad y especificidad de los estudios del proteoma. En estos *microarrays* se fijan en la grilla de la placa o *chip* (ver sección anterior), gran cantidad de ligandos específicos (por ejemplo, anticuerpos o *aptámeros** sintéticos de ARN) para distintas proteínas. Al agregar sobre esa superficie la muestra, es posible reconocer a qué ligandos se han unido proteínas e identificarlas.

La actividad de investigación en el campo de la proteómica es actualmente muy intensa. Es dable esperar que estos estudios tengan impacto en medicina, mejorando las posibilidades de diagnóstico y tratamiento. Numerosas enfermedades provocan alteraciones en el patrón de proteínas expresadas en los tejidos afectados. El proteoma en esos casos mostrará un perfil anormal que, además de señalar el proceso patológico, puede contribuir a comprender mejor su patogénesis. Por otra parte, dado que la mayoría de los objetivos o "blancos" de los fármacos son proteínas, el conocimiento de las proteínas relacionadas con estados patológicos puede servir al desarrollo de fármacos más selectivos y eficientes.

MEDICINA PERSONALIZADA

Los estudios del genoma, transcriptoma, proteoma y metaboloma han revelado gran variabilidad entre individuos de la población humana, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Esta variabilidad se expresa, por ejemplo, en el hecho de que no todas las personas responden igual al tratamiento con determinados fármacos. Algunos pacientes responden favorablemente, otros lo hacen en menor medida o no responden en absoluto, o hasta sufren severos efectos adversos.

La *farmacogenética* estudia este fenómeno y ha demostrado un notable polimorfismo en enzimas, transportadores y receptores comprometidos en la metabolización de medicamentos. Por ejemplo, se cita el caso de los citocromos P450 que catalizan reacciones de oxidación de xenobióticos. Constituyen una familia con numerosas isoenzimas y variantes alélicas con capacidades diferentes. Esto hace que algunos individuos sean buenos metabolizadores de un determinado fármaco y otros lo sean menos.

Es de esperar que el desarrollo de la metodología genómica y proteómica reduzca significativamente su costo y la hagan más accesible, generalizando su práctica. Teóricamente, esto permitiría adaptar el tratamiento a las características de cada paciente y alcanzar una *Medicina*

* Se denominan aptámeros a moléculas o segmentos de moléculas de ARN de cadena de corta extensión, y también péptidos, cuyas estructuras secundaria y terciaria les otorgan una conformación que permite un encaje recíproco con segmentos de otras moléculas a las que fijan selectivamente.

Personalizada, generalmente descripta como aquella que provee el medicamente adecuado, a la dosis correcta, en el momento preciso.

De cualquier modo, es probable que los análisis necesarios sigan requiriendo un equipamiento importante de los laboratorios y sus costos no estén al alcance de todos los pacientes, creando nuevas situaciones de inequidad social.

MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS VIRUS

Los virus son agentes patógenos formados por una o más hebras de ácido nucleico (ADN o ARN) encerradas en una cubierta proteínica denominada cápside (pág. 128). El ácido nucleico contiene la información genética que codifica para todas las moléculas constituyentes del virus. Los virus más simples poseen 3 genes; los más complejos alcanzan a tener alrededor de 250.

Las partículas virales no pueden multiplicarse por sí mismas pues carecen de los factores necesarios para la síntesis de sus propias estructuras y de mecanismos productores de energía. A fin de reproducirse, invaden una célula y utilizan su maquinaria biosintética.

En general, los virus penetran en las células por mecanismos semejantes a los utilizados por otras partículas y macromoléculas. Las proteínas de cubierta del virus, en muchos casos glicoproteínas, se fijan a otras de la membrana plasmática que actúan como receptores. Se produce una invaginación de la membrana y la partícula viral pronto queda englobada en una vesícula, introducida en la célula por endocitosis (pág. 220). En el interior de la célula, la partícula viral pierde su cubierta proteica y el ADN o ARN queda libre en el citoplasma. Los virus poseen factores capaces de frenar la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas de la célula parasitada y de activar la producción de sus propias moléculas. En otros términos, el virus obliga a la maquinaria metabólica de la célula a trabajar para su propia multiplicación. Constituye un caso extremo de parasitismo.

En los virus con ADN, la replicación y transcripción sobre el molde que suministra el virus se inicia utilizando las polimerasas y otras enzimas de la célula infectada, que también provee la materia prima (nucleósidos trifosforados y aminoácidos) y la energía necesarias.

Los bacteriófagos, virus que infectan bacterias, han sido intensamente estudiados. No penetran en las células por endocitosis, sino utilizando un complejo dispositivo para introducir su información genética. Los bacteriófagos, o más simplemente *fagos*, se adosan con su base o pie (ver pág. 128) a la pared bacteriana y la perforan. De inmediato se produce una brusca contracción y el ADN contenido en la cabeza del fago se introduce en el cuerpo de la bacteria. En estos virus sólo el ADN penetra en la célula hospedera; queda en el exterior la cubierta proteínica, que actúa como una jeringuilla descartable, cuya misión termina una vez inyectado el ADN en la bacteria (fig. 22-7). Pocos minutos después de la invasión, la síntesis de ADN, ARN y proteínas bacterianas cesa y comienza la síntesis de moléculas propias del virus. Con ellas se procede al ensamble de partículas virales completas. A los veinte minutos de iniciada la infección, se ha formado una gran cantidad de nuevos fagos en el interior de la bacteria. Finalmente, ésta se lisa y libera los bacteriófagos, cada uno de los cuales está en condiciones de atacar otra bacteria.

No todos los virus conducen irremediablemente a la destrucción de la célula parasitada (vía lítica); hay algunos cuyo ADN se integra en el genoma del hospedero y continúa replicándose con éste sin expresarse en la producción de partículas virales (vía lisogénica). Son los llamados virus atenuados que, por acción de factores activadores, pueden empezar a multiplicarse dentro de la célula portadora y eventualmente lisarla. Entre los virus atenuados, uno de los más estudiados ha sido el fago lambda (λ).

En los virus con ARN, la célula infectada no posee enzimas capaces de replicar dicho ácido nucleico. El virus provee no sólo la información genética, sino también la polimerasa requerida.

El mecanismo de síntesis varía según la relación existente entre el ARN viral y el ARN mensajero necesario para la síntesis de sus proteínas. Arbitrariamente se designa ARN (+) al que tiene secuencia idéntica a la del ARN mensajero y ARN (−) al que posee una secuencia complementaria a aquél. De acuerdo con las características de su ácido nucleico, los virus se dividen en cuatro tipos. *Clase 1*, ARN (+): después de la infección debe sintetizarse una cadena ARN (−) complementaria y ésta sirve de molde para ensamblar el ARN mensajero (ej.: virus de la poliomielitis). *Clase 2*, ARN (−): sirven directamente de guía para la síntesis de ARN mensajero (ej.: virus de la rabia). *Clase 3*, ARN de doble hebra (±): el ARN mensajero se ensambla sobre la cadena (−) del dúplex (ej.: reovirus). Los tres tipos de virus mencionados poseen una ARN polimerasa dependiente de ARN, llamada *ARN replicasa*, que cataliza la síntesis de nuevo ARN. *Clase 4, retrovirus*: poseen una cadena de ARN (+) que sirve de molde para la síntesis de ADN. Se altera aquí

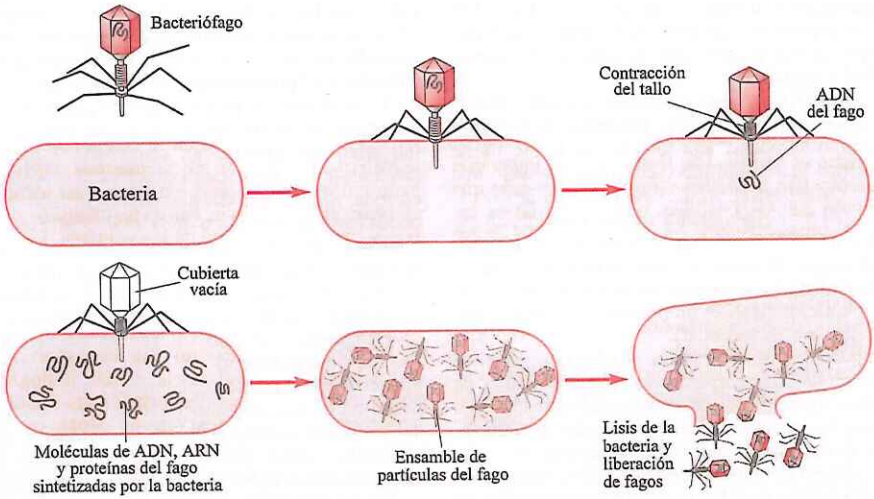


Fig. 22-7. Representación esquemática de la multiplicación de bacteriófagos utilizando el aparato de síntesis de ácidos nucleicos y proteínas de una bacteria hospedera (vía lítica).

el sentido del flujo de información propuesto por el "dogma genético": ADN→ARN→Proteína. En este caso, el orden de la transcripción inicial se invierte y va de ARN a ADN, para seguir luego el sentido habitual. La síntesis del ADN es catalizada por una ADN polimerasa dependiente de ARN o *transcriptasa inversa*, provista por el propio virus. La enzima cataliza el ensamble de una hebra de ADN complementaria de la del patrón de ARN viral. Luego éste se desprende y sobre la primera cadena de ADN, se sintetiza otra complementaria para formar la doble hélice. El ADN resultante posee toda la información genética del virus y se incorpora al genoma de la célula hospedera donde será transcripto en lo sucesivo.

Gracias a la simplicidad de su genoma, los virus han sido ampliamente utilizados en los estudios sobre el funcionamiento de los ácidos nucleicos como depositarios y transmisores de información. Con ellos se ha adquirido valiosísima información al respecto.

ONCOGENES

El cáncer, nombre genérico que el uso corriente da a los procesos neoplásicos malignos, se debe a una transformación de las células, cuya principal manifestación es su proliferación desordenada, incontrolada, invasiva. Además de la exageración de su actividad mitótica, una célula cancerosa presenta otras notables alteraciones en su morfología y en sus características metabólicas, que dan un cuadro de complejas y múltiples anomalías.

Por otro lado, cuando se indaga sobre las posibles causas de la degeneración maligna, se obtienen muchas respuestas diferentes. Se conocen tumores producidos por virus, otros provocados por agentes químicos, otros por radiaciones y otros, la mayoría, en los cuales no es posible detectar agente causal.

Esta entidad polifacética ha resistido durante tiempo los intentos por encontrar un común denominador para el mecanismo productor de los diferentes tipos de neoplasias. Evidencias más recientes han aportado elementos para una interpretación unitaria del proceso de degeneración maligna de las células. Hoy se puede hablar de bases moleculares del cáncer sobre datos experimentales y afirmar que las neoplasias, cualquiera sea su causa aparente o sus características anatomoclínicas, obedecen a una alteración genética.

Son responsables de la transformación cancerígena un grupo de genes llamados *oncogenes* (onco: tumor).

Las observaciones iniciales en este sentido proceden del campo de la virología. Desde hace tiempo se conoce la existencia de virus oncogénicos, es decir, productores de tumores. Generalmente pertenecen al grupo de los retrovirus, cuyo material genético está constituido por ARN. La célula infectada transcribe la información del

ARN viral a ADN de doble hélice, gracias a la transcriptasa inversa del propio virus. Ese ADN es incorporado al genoma de la célula y es transcripto como propio para la síntesis de nuevos ARN y proteínas.

Un retrovirus muy utilizado en estos estudios es el del sarcoma de Rous, productor de un tumor maligno en pollos. Las técnicas de la ingeniería genética han permitido comprobar que sólo una porción del ARN viral es responsable de su capacidad tumorigénica. La versión en ADN de ese trozo de ARN codifica para la síntesis de una proteína capaz de alterar el comportamiento de la célula parasitada y convertirla en cancerosa. Dicho segmento de ADN es un oncogén, designado con la sigla *src* (de sarcoma).

Poco después del aislamiento del oncogén *src* se hizo un hallazgo sorprendente. El gen *src* no es de origen viral; procede del genoma del animal hospedador. En las células de pollos normales, no infectados, se encuentran genes casi idénticos al *src*.

¿Cómo se explica que el ARN del virus posea un fragmento de información igual al existente en el animal hospedador? Muchos retrovirus, al infectar células y replicarse en ellas incorporan a su genoma trozos de información genética del hospedador; tal es el caso del gen src. En infecciones subsiguientes, este segmento es introducido en una célula normal con el resto del ARN viral, ahora convertido en oncogén. El trozo de ADN normal precursor del oncogén es denominado protooncogén. En algún momento de la evolución, en alguna célula, el protooncogén se adhirió al genoma viral y las generaciones siguientes del virus adquirieron potencial oncogénico.

Las neoplasias de origen viral, especialmente en el ser humano, son una minoría, las observaciones referidas comprenden sólo una fracción poco significativa de los tumores conocidos. Sin embargo, nuevas investigaciones permitieron extender la relevancia de los oncogenes a tumores no virales.

La transferencia a células normales de ADN de tumores malignos humanos, o de células transformadas por agentes cancerígenos, induce degeneración neoplásica. Pudo demostrarse no sólo la transmisión del carácter maligno de una célula a otra con ADN como vehículo, sino también que sólo un segmento, correspondiente al oncogén, era el responsable de la transformación. A estos oncogenes se los llamó *celulares* y se los designa anteponiendo la letra *c* a la sigla de tres letras correspondiente al oncogén (ej. *c-ras*), para distinguirlos de los *virales*, a los cuales se los distingue con la letra *v* (ej.: *v-src*).

Los oncogenes celulares, como los virales, son virtualmente copias de protooncogenes presentes en células normales. El protooncogén adquiere en las células transformadas, y también al incorporarse al genoma de un retrovirus, propiedades nuevas que conducen a la degeneración cancerosa; el protooncogén se ha "activado".

La existencia de protooncogenes planteó el interrogante de su función en la célula normal. Es llamativo encontrarlos en numerosas especies, hasta en la levadura, con estructura casi idéntica en todas ellas. Es decir, han experimentado muy pocos cambios a lo largo de la evolución. Las células han mantenido sin modificaciones estos genes que pueden considerarse como gérmenes de su propia destrucción. Así planteado el problema, los protooncogenes parecen un absurdo biológico.

En general, cuando un gen es conservado con tal inmutabilidad en la escala biológica, puede asegurarse que debe cumplir una función importante. Los protooncogenes deben codificar proteínas involucradas en la regulación del desarrollo celular, puesto que los oncogenes de ellos derivados inducen proliferación anómala.

La investigación de proteínas cuya síntesis es controlada por protooncogenes apoya esta hipótesis. Los protooncogenes controlan el crecimiento celular normal. Codifican factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, factores de transcripción y otras proteínas relacionadas con el desarrollo celular.

Los protooncogenes del grupo *ras* codifican para proteínas que se unen a GTP. En el capítulo 24 se indicará el papel de este tipo de proteínas como mediadoras en sistemas de señales (pág. 499). Otro protooncogén, llamado *myc*, dirige la síntesis de un factor de transcripción normalmente estimulado por factores de crecimiento.

En resumen, los protooncogenes dirigen la síntesis de proteínas "clave" en el control del crecimiento y desarrollo celular y, por ende, cumplen normalmente una función de la mayor importancia.

Los mecanismos por los cuales un protooncogén se convierte en oncogén y confiere malignidad a la célula son variados:

1. **Mutación.** Cambios de bases producidos por distintas causas, ya sean productos químicos, radiaciones u otras, pueden determinar la conversión de un protooncogén en oncogén. Generalmente se requiere acumulación de varias mutaciones para que una célula normal se transforme en maligna.

2. **Amplificación génica.** Un protooncogén puede sufrir varias replicaciones y producir múltiples copias. Por ejemplo, se ha comprobado la existencia de treinta copias del protooncogén *ras* en células de un tumor humano.

3. **Translocación o transposición.** Un trozo de cromosoma en el cual reside un protooncogén se separa y se fija en otro cromosoma. Por ejemplo, el linfoma de Burkitt, tumor maligno de tejido linfático en humanos, es producido por este mecanismo. Las células transformadas son linfocitos B con una transposición cromosomal; un pequeño segmento del extremo de un cromosoma, en el cual se encuentra el protooncogén *myc*, es translocado al extremo de otro cromosoma, a continuación de un gen que codifica para inmunoglobulina. Los genes para anticuerpos son muy activos en linfocitos B. En razón de la proximidad, el protooncogén funciona con la misma intensidad que el de la inmunoglobulina, pues queda a merced del mismo regulador.

4. **Activación por retrovirus.** La información correspondiente a un protooncogén es incluida en el material genético de un retrovirus. Cuando éste infecta una célula, el protooncogén introducido adquiere capacidad oncogénica, pues es expresado al ritmo controlado por el promotor viral, que tiene gran actividad.

De los mecanismos mencionados, todos producen algún tipo de alteración en la síntesis de la proteína normalmente codificada por el protooncogén. La mutación modifica la estructura primaria y afecta su comportamiento de manera tal que conduce a la transformación maligna de la célula. En los casos restantes se produce aumento en la actividad del protooncogén y se estimula la síntesis de la proteína respectiva. Algunos autores sostienen la hipótesis de la "dosis": las proteínas codificadas por los protooncogenes cumplen su función normal en las concentraciones fisiológicas, pero promueven transformación maligna cuando su cantidad en la célula aumenta exageradamente.

El hallazgo de oncogenes ha aportado nuevos elementos para dilucidar, a nivel molecular, el mecanismo de la degeneración cancerosa.

Genes supresores de tumores

El descubrimiento de los oncogenes demostró que la actividad aumentada o alterada de determinados genes causa degeneración maligna de algunas células. Posteriores hallazgos probaron la existencia de otras alteraciones genéticas responsables de la génesis de tumores.

RBl. Estudios en pacientes con *retinoblastoma*, un tumor de retina, indicaron que su desarrollo está relacionado con la pérdida de un gen. La predisposición a padecer retinoblastoma es hereditaria. Existe también una forma esporádica, no heredada. En el primer caso, los pacientes han recibido de uno de sus padres una mutación consistente en una deleción en el cromosoma 13, donde reside el llamado gen RBl (de retinoblastoma). Si además de este defecto se produce, en células de la retina, una mutación somática que inactiva el otro alelo RBl, se pierden ambas copias del gen y se desarrolla el tumor. En las formas esporádicas de retinoblastoma, los cromosomas heredados de ambos padres son normales, pero mutaciones somáticas determinan la inactividad de los dos alelos RBl en células retinianas. La causa del tumor es la pérdida absoluta de la función del gen, para lo cual deben estar afectados ambos alelos. Con los oncogenes, en cambio, un alelo anormal es suficiente para provocar desarrollo de tumores. El gen RBl codifica una fosfoproteína nuclear de 110 kDa que se une al ADN e inhibe la transcripción de oncogenes como *myc* y *fos*.

La pérdida del gen RBl permite la expresión de genes cancerígenos. La ausencia de este antioncogén podría ser también la causa de cáncer en pulmón, mama y colon.

p53. Otro gen supresor de tumores, localizado en el brazo corto del cromosoma 17, codifica la proteína *p53*. El ARNm de p53 es de alrededor de 2,5 kb y contiene información para la síntesis de una proteína nuclear de unos 53 kDa que actúa como factor de transcripción.

Normalmente esta proteína se encuentra en muy bajas concentraciones. Cuando se produce un daño en el ADN se induce aumento de la cantidad de moléculas de p53 y se dispara una vía de señales que activa proteína quinasas. Un importante sustrato de esas quinasas es la proteína p53, que cuando está fosforilada actúa como reguladora de la actividad génica. Su molécula tiene asas que pueden entrar en contacto específicamente con bases nucleotídicas en los surcos de la doble hélice.

La función principal de p53 es proteger al organismo contra las consecuencias del daño celular y el riesgo de cáncer.

La exposición a factores como hipoxia, agentes oxidantes, tóxicos químicos, radiaciones ultravioleta o gamma, gran actividad de oncogenes como *Ras* y *Myc*, proliferación celular exagerada, son todas condiciones que aumentan la concentración de p53. Esta ejerce múltiples acciones: a) es capaz de bloquear el ciclo celular en fase G_1 (pág. 413); inhibe quinasas dependientes de ciclinas y detiene el ciclo tratando de dar tiempo para que el aparato de reparación de ADN subsane el daño. Si éste no puede ser corregido, induce la muerte celular (apoptosis, pág. 703). Son también funciones de p53 la inhibición de la angiogénesis, indispen-

sable para el crecimiento de tumores, y otras que resguardan la estabilidad genética, por ejemplo, cuando los telómeros quedan muy cortos, p53 inhibe la división celular por un mecanismo llamado de senescencia celular replicativa.

El gen que codifica la proteína p53 está mutado en casi el 50% de los cánceres humanos. Cuando falta p53 las células neoplásicas siguen proliferando aun cuando el ADN esté dañado, lo que permite la acumulación de mutaciones y el aumento de la malignidad del tumor. También se deprime la apoptosis, lo que impide la destrucción de las células anormales.

Las evidencias disponibles al presente indican que p53 es el más importante gen supresor de tumores.

EPIGENÉTICA

Se denominan *epigenéticos* los cambios heredables en la expresión génica que ocurren sin modificación de la secuencia o estructura primaria del ADN. Estos cambios ocurren principalmente en las células germinales y en etapas tempranas de la embriogénesis y subsisten a través de las sucesivas divisiones celulares o aún a través de varias generaciones.

Los principales cambios epigenéticos son: a) metilación del ADN, b) modificaciones covalentes de las histonas y c) acciones de ARNs no codificantes.

a) *Metilación de ADN*. Comprende la inserción de grupos metilos en posición 5' de citosinas catalizada por ADN metil transferasas. Las citosinas metiladas son aquellas adyacentes a guaninas en zonas ricas en dinucleótidos CG, llamadas "islas CpG", frecuentemente localizadas en promotores de genes, sitios donde la transcripción del ADN es iniciada o regulada. Esta metilación tiende a silenciar los genes correspondientes. El proceso inverso, la desmetilación, catalizada por ADN metilasas, aumenta la expresión de los genes y es particularmente crítica en las gametas y durante el desarrollo inicial del embrión.

b) *Modificación de las histonas*. Comprende acetilación, metilación, fosforilación, ubicuitinación (pág. 328), sumoilación (pág. 480), ADP ribosilación (pág. 478) y glicosilación. Estos cambios en las histonas modifican el grado de compactación de la cromatina y con ello la accesibilidad a la misma, lo cual afecta la transcripción del ADN. Los más comunes son la acetilación y la metilación de residuos lisina en el extremo amino terminal de histona 3 (H3) e histona 4 (H4).

Algunos segmentos de la cromatina o cromosomas enteros están muy compactados (*heterocromatina*) y los genes contenidos en ellos no pueden expresarse. Otras porciones o cromosomas están relajados, distendidos (*eucromatina*), lo que permite el libre acceso de los factores de transcripción, enzimas (polimerasas) y sustratos necesarios para la síntesis de ARN.

La acetilación, catalizada por *histona acetil transferasas*, reduce la compactación de la cromatina e induce activación de la transcripción. En cambio, la desacetilación catalizada por histona desacetilasa, reprime la transcripción. La metilación se asocia a incremento o represión según la ubicación de los residuos lisina metilados.

c) *Acción de ARN no codificante* (micro ARNs y ARNs largos no codificantes) su acción será descripta en el capítulo siguiente.

Todas las células de un individuo tienen el mismo genoma, pero las modificaciones epigenéticas, al cambiar la expresión de ciertos genes, pueden producir variabilidad aún entre células de un mismo tejido.

Se han demostrado cambios epigenéticos relacionados con factores endócrinos, ambientales, dieta, degeneración maligna y otras. Por ejemplo, hijos de madres alimentadas con dietas pobres en proteínas durante el embarazo y lactancia, tienen expresión reducida de factores de transcripción y en la adultez suelen manifestar tendencia a la obesidad, diabetes tipo 2, hipertensión y otras afecciones del sistema cardiovascular.

Un caso interesante es el de las abejas. La abeja reina, alimentada con jalea real, pone huevos y vive años. En cambio, las abejas obreras, que no ingieren jalea real, son estériles y viven sólo semanas. Se ha comprobado que la jalea real promueve la metilación de varios genes.

El alcoholismo, el tabaquismo y contaminantes ambientales pueden alterar epigenéticamente la expresión de genes.

La relación entre epigenética y cáncer ha sido intensamente estudiada. En general, los patrones de metilación de ADN y de acetilación y metilación de histonas suelen estar alterados en tumores malignos. Genes que codifican proteínas supresoras de tumores son silenciados.

Impronta genómica (en inglés *genomic imprinting*) es considerada un fenómeno epigenético que determina la expresión de sólo uno de los alelos parentales en la descendencia. Generalmente ocurre en las gametas. Un locus o grupo de genes es silenciado, comúnmente por metilación, en los gametos de la madre o del padre; en consecuencia, únicamente el alelo del padre o de la madre se expresará en la progenie.

Los genes "improntados" regulan el crecimiento y desarrollo fetal y del recién nacido, tienen influencia en la alimentación del lactante y en los cuidados maternos.

Defectos en los genes comprometidos contribuyen a la producción de enfermedades, por ejemplo, en algunos raros casos puede darse que exista una deleción en un cromosoma de las gametas de uno de los padres. Si se produce una deleción en el cromosoma 15 del espermatozoide y el embrión recibe sólo el patrón de impronta de la madre en ese segmento, el nuevo ser presentará el *síndrome de Prader-Willi*, caracterizado por retardos de crecimiento y mental, obesidad, hipogonadismo, debilidad muscular. Cuando el defecto es a la inversa, y la impronta que recibe el feto es sólo paterna, resulta el *síndrome de Angelman*, con déficit mental, epilepsia y temblores.

RESUMEN

El ADN es el material portador de la información genética. El proceso de replicación asegura que todas las células de un individuo, originadas por divisiones sucesivas de la célula huevo, reciban un ADN idéntico en cantidad y estructura. El ordenamiento de los nucleótidos en el ADN transcripto a ARNm es un "mensaje en clave" que indica la secuencia de aminoácidos en la proteína a sintetizar. El ARNm sirve de plantilla sobre la cual se efectúa el ensamble de aminoácidos de la proteína. El mensaje del ARNm, expresado con las bases A, G, C y U, es traducido en secuencia de aminoácidos.

Código genético. La unidad de información en el ARNm es un triplete de bases llamado *codón*. Con las 4 bases se componen 64 codones diferentes. Cada aminoácido está representado por uno o más tripletes (codones sinónimos). UAA, UAG y UGA indican terminación de la cadena polipeptídica. El código tiene validez universal, pues el significado de los codones es el mismo en todos los seres vivos (existen unas pocas excepciones en el ADN mitocondrial y en algunos organismos unicelulares). La sucesión de codones con la información completa para la síntesis de una cadena polipeptídica se denomina *cistrón*. En bacterias, un cistrón es un trozo continuo de ADN codificante. En eucariotas, en general, los cistrones contienen fragmentos (*exones*) separados por porciones que no poseen información para la síntesis de ARN (*intrones*). Casi siempre la extensión de los intrones supera ampliamente a la de los exones.

ARNm. Durante la transcripción se sintetiza ARN sobre el molde de una de las hebras del ADN, llamada hebra antisentido o no codificante. La otra cadena, no transcripta, tiene la misma secuencia que el ARN sintetizado; es la hebra con sentido o codificante. En eucariotas se transcriben exones e intrones para formar el precursor de ARNm, que forma parte del llamado ARN nuclear heterogéneo. El ARNm precursor es sometido en el núcleo a importantes cambios. Además de agregarle el "capuchón" de 7-metil-GTP en el extremo 5' y la "cola" de poli A en el 3', deben eliminarse los intrones. Esto se realiza por corte y empalme de los exones (*splicing*). Cada intrón tiene en sus extremos y en una porción intermedia secuencias donde se fijan RNPnp. Se forma un complejo (*spliceosome*) que procede al corte exacto en el límite entre el intrón y los exones que lo flanquean. Luego los exones son unidos extremo a extremo en el orden correcto. El producto terminal es ARNm "maduro", que se exporta al citoplasma. En eucariotas, cada molécula de ARNm tiene información para la síntesis de una cadena polipeptídica: es monocistrónico. En bacterias, el ARNm puede ser policistrónico.

Ribozimas. Existen ARN que se comportan como enzimas. En muchos casos el mismo ARN cataliza la escisión de intrones. Ribonucleasa P es una ribozima que participa en el procesamiento de ARNt.

Biosíntesis de proteínas. 1. *Activación de aminoácidos*. Requiere aminoácidos libres, aminoacil-ARNt sintetasas, ARNt, ATP y Mg^{2+}. El aminoácido reacciona con ATP para formar aminoacil-AMP-enzima. El aminoácido activado es transferido al ARNt específico. 2. *Iniciación*. Varios factores de iniciación (FIe) interaccionan con el "capuchón" del extremo 5' del ARNm. A éste se unen también la subunidad ribosomal menor (40S) y metionil-$ARNt_i$ con FIe-2 fijado a GTP, para formar el *complejo de preiniciación*. El complejo se desplaza sobre el ARNm en sentido 5'⟶3' hasta ubicar el codón de iniciación (AUG), al cual se aparea el anticodón del $ARNt_i$. Se agrega la subunidad mayor y metionil-$ARNt_i$ se adhiere al sitio P. Se forma el *complejo de iniciación* de 80S. 3. *Elongación*. Se realiza en un ciclo que se repite con cada aminoácido agregado. Se une al sitio A el aminoacil-ARNt cuyo anticodón se adapte al codón correspondiente en el ARNm. *Formación de la unión peptídica y translocación*. El grupo carboxilo de la metionina del $ARNt_i$ en el sitio P se une a la función amina del aminoácido del ARNt en A. Reacción catalizada por peptidiltransferasa. Se forma un dipeptidil que queda unido al ARNt ubicado en el sitio A. El $ARNt_i$ del sitio P, descargado de su metionina, es liberado. El dipeptidil-ARNt se desplaza del sitio A al P. El ribosoma avanza al siguiente codón sobre el ARNm en el sentido 5'⟶3' y se repite el ciclo. Cuando han transcurrido varios ciclos, la cadena peptídica unida al ARNt en el sitio P ha crecido en longitud. La proteína se ensambla desde el extremo N al C-terminal. La cadena es transferida al ARNt en A. El gasto energético de la formación de un enlace peptídico es de cuatro uniones de alta energía. 4. *Terminación*. Una vez completada la cadena, se llega a un codón de terminación (UAA, UAG y UGA) reconocido por el factor de liberación (FLe) asociado a GTP. La cadena polipetídica es separada del ARNt por hidrólisis. Se liberan el ARNt descargado y las subunidades ribosómicas. Una cadena de ARNm dirige simultáneamente la síntesis de varias moléculas de proteína. El conjunto de 8 o más ribosomas sobre el ARNm se llama *polisoma*.

Acción de antibióticos. Hay antibióticos que bloquean el proceso de transcripción (actinomicina D, rifamicina, rifampicina); otros afectan la traducción (puromicina, estreptomicina, neomicina, gentamicina, tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina, cicloheximida, kirromicina, ácido fusídico).

Mutaciones. Son cambios en la secuencia del ADN del genoma. Pueden ser puntuales, cuando afectan sólo un par de bases, o comprender cambios estructurales más extensos en los cromosomas. Muchas enfermedades obedecen a defectos del material genético (mutaciones) que llevan a producir proteínas anormales o impiden la síntesis. Las mutaciones en células germinales se transmiten a la descendencia. Normalmente, la incidencia de mutaciones "espontáneas" es muy baja. Existen factores mutagénicos (radiaciones ionizantes, rayos ultravioletas, diversos compuestos químicos) que incrementan la frecuencia de mutaciones.

Proteoma. Total de proteínas sintetizadas por un organismo.

Transposones. Son secuencias de ADN capaces de insertarse en distintas localizaciones del genoma. *Retroposones*. Introducidos en el genoma por transcripción invertida a partir de retrovirus.

Virus. Penetran en la célula e introducen en ella su material genético (ADN o ARN), obligando a la maquinaria metabólica del hospedador a trabajar para la multiplicación viral. *Interferón*. Son proteínas producidas en células infectadas, que otorgan protección inespecífica contra virus.

Oncogenes. Responsables de transformación maligna de células. Normalmente existen proto-oncogenes, que codifican proteínas relacionadas con la regulación del desarrollo y multiplicación celular. Pueden ser convertidos en oncogenes por mutación, amplificación, transposición, activación por retrovirus, factores que incrementan exageradamente su actividad.

Epigenética. Cambios en la expresión de genes sin modificación de la secuencia del DNA. Pueden inducirse por alteraciones en la conformación de histonas, metilación de DNA y otras.

BIBLIOGRAFÍA

Afshari S.A. (2002). Microarray technology, seeing more than spots. *Endocrinology*, 143: 1983-1989.

Alberts B., Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, 5ta. Ed., Taylor & Francis Group, Nueva York.

Conaway R.C., Sato S., Chieri T.S., Tingtin Y., Conaway J.W. (2005). The mammalian mediator complex and its role in transcriptional regulation. *Trends in Biochemical Sciences*, 30: 250-255.

Cooper G.M., Hausman R.E. (2007). *The Cell. A Molecular Approach*. 4ta. Ed., Sinauer Associates, Inc. Sunderland.

Eccleston A., Eggleston A.K. (Ed.) (2004). RNA interference. *Nature*, 431: 337-378.

Eggleston A.K. (Ed.) (2009). RNA silencing. *Nature*, 457: 395-434.

Eichler E.C., Clark R.A., She X (2004). An assessment of the sequence gaps: Unfinished business in a finished human genome. *Nature Reviews. Genetics*, 5: 345-354.

Kornblihtt A.R., Schor I.E., Alló M., Dujardin G., Petrillo E., Muñoz M.J. (2013).Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology,* 14: 153-165.

Krebs J.E., Goldstein E.S., Kilpatrick S.T. (2013). *Lewin's Genes XI*, Jones and Bartlett Publishers Inc., Burlington.

Larsson N.G., Clayton D.A. (1995). Molecular aspects of human mitochondrial disorders. *Annual Review of Genetics*, 29: 151-178.

Lodish H., Berk A., Kaiser C.A., Kriger M. (2007). *Molecular Cell Biology*, 6ta. Ed., W.E. Freeman, Nueva York.

Marte B. (Ed.). (2003). Proteomics. *Nature*, 422: 191-237.

Melo E.O, Canavessi A.M, Franco M.M, Rumpf R. (2007). Animal transgenesis: state of the art and applications,. *Journal of Applied Genetics*; 48: 47-61.

Ohtsuka M., Kimura M., Tanaka M., Inoko H. (2009). Recombinant DNA technologies for construction of precisely designed transgene constructs. *Current Pharmacology Biotechnology*.10: 244-251.

Peters J. (2014). The role of genomic imprinting in biology and disease: an expanding view. *Nature Review. Genetics*, 15: 517-530.

Scheper G.C., van der Knaap M.S., Proud C.G. (2007). Translation matters: protein synthesis defects in inherited disease. *Nature Reviews Genetics*, 8: 711-723.

Serganov A., Patel D.J. (2007). Ribozymes, riboswitches and beyond: regulation of gene expression without proteins. *Nature Reviews Genetics*, 8: 776-790.

Sherrat E.J., Thomas A.W., Alcolado J.C. (1997). Mitochondrial DNA defects. A widening clinical spectrum of disorders. *Clinical Science*, 92: 225-235.

Shore D. (1997). Telomere length regulation. Getting the measure of chromosome ends. *Journal of Biological Chemistry*, 378: 591-598.

Solari A.J. (2004). *Genética Humana*, 3ra. Ed., Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.

Watson J.D., Baker T.A., Bell S.P. Gann A., Levine M., Losick R. (2008). *Molecular Biology of the Gen*, 6ta. Ed., Pearson Benjamin Cummings, Cold Spring Harbor Laboratory Press, San Francisco.

Weaber R.F. (2008). *Molecular Biology*, 4ta. Ed., Mc Graw Hill, Nueva York.

CAPÍTULO 23

Regulación de la expresión génica

La actividad del genoma es finamente regulada por numerosos factores.

En procariotas la expresión de los genes es regulada principalmente a nivel de la transcripción. En bacterias existen unidades de transcripción llamadas *operones*. Un operón está formado por un conjunto de genes que codifican proteínas funcionalmente relacionadas, bajo control del mismo promotor. Existen proteínas regulatorias que se unen al promotor y estimulan (inducen) o inhiben (reprimen) la unión de la ARN polimerasa y, con ello, el comienzo de la transcripción.

En eucariotas pluricelulares los mecanismos de regulación génica son necesariamente más complejos. Si bien todas las células de un organismo poseen el mismo potencial genético, existen grandes diferencias entre ellas respecto a los genes que se expresan en un momento dado. En general, sólo una pequeña proporción del genoma se encuentra en actividad en cada célula; la mayor parte está silenciada.

A partir del huevo se forma un organismo completo, constituido por multitud de tejidos diversos, con células cuya morfología y especialización funcional difieren notablemente. Este proceso de diferenciación se alcanza a través de la regulación selectiva de la actividad génica en cada célula. Es éste un fenómeno de enorme importancia biológica. Como ejemplo, citaremos el caso de la síntesis de hemoglobina en humanos. Todas las células contienen los genes que codifican globina; sin embargo, sólo las precursoras de eritrocitos producen dicha proteína. Neuronas, fibroblastos, adipocitos, pese a disponer de la información genética, nunca sintetizan globina; los genes respectivos no funcionan en ellos. Aun en eritroblastos, los genes para las distintas cadenas de globina se activan en períodos definidos del desarrollo. Las unidades γ sólo se sintetizan durante el período fetal; después del nacimiento, el gen correspondiente se silencia para todo el resto de la vida del individuo.

Es evidente que existen eficaces sistemas de control de la actividad génica.

Regulación génica en eucariotas

No se ha demostrado en eucariotas la existencia de conjuntos funcionales de genes semejantes a los operones de procariotas, pero suelen encontrarse grupos de genes cuya actividad es modulada por un mismo factor.

Si bien el de transcripción es el proceso sobre el cual actúa la mayor parte de los factores regulatorios, el control del tipo y cantidad de proteínas sintetizadas en la célula se puede ejercer a otros niveles, como se indica a continuación.

Modificación del número y estructura de genes. *Pérdida de genes*. La eliminación total o parcial de genes impide la producción de los ARN y proteínas correspondientes. Los eritrocitos son un caso extremo en el cual se pierde la totalidad del genoma. *Amplificación*. Se generan múltiples copias de un gen para ampliar la capacidad de producción de moléculas requeridas en gran cantidad por la célula. Ejemplo: histonas y ARN ribosomales. *Reorganización de genes*. Segmentos de ADN pueden desplazarse de un sitio a otro asociándose de diversas formas. Ejemplo: genes de linfocitos B productores de anticuerpos

(pág. 662). *Modificación química.* La *metilación de restos citosina* en el ADN, especialmente en los sitios promotores, dificultan la transcripción. Los genes metilados en sitios específicos reducen marcadamente su actividad o no son expresados en absoluto. Por ejemplo, los genes de globina están más extensamente metilados en células no productoras de hemoglobina que en eritroblastos.

La metilación de citosinas del ADN puede estar relacionada con el control de la transformación celular maligna. Se ha demostrado que determinados genes, como los de hormona de crecimiento y algunos protooncogenes (pág. 462) en células de tumores de pulmón y colon están notablemente menos metilados que los de tejidos normales vecinos.

Regulación de la transcripción. En general, la decisión de producir o no una proteína determinada, se toma a nivel de la transcripción.

Condensación de cromatina. Un aspecto importante en la expresión de la información contenida en los genes eucariotas es el relacionado con la accesibilidad del ADN. El proceso de transcripción exige una íntima interacción del ADN con un conjunto de proteínas y otras moléculas. Por esta razón debe existir libre acceso a todos los tramos de la doble hélice. El grado de "empaquetamiento" de la cromatina nuclear es un factor fundamental. El ADN incluido en acúmulos altamente condensados, característicos de la llamada heterocromatina, no es expresado. Se cree que sólo pueden ser transcriptas las porciones de la molécula de ADN comprendidas en la eucromatina desplegada. En otros términos, la estructura terciaria del ADN (superenrollamientos) tiene gran influencia en la transcripción. En eucariotas el ADN se asocia a histonas formando estructuras denominadas nucleosomas (pág. 123). Sólo en los segmentos de ADN extendidos de un nucleosoma a otro (trozos de ADN "desnudo") es posible el acceso de proteínas reguladoras, las cuales actúan silenciando o activando determinados genes. Se ha sugerido que los nucleosomas sufren desplazamientos para dejar expuestos segmentos correspondientes a los promotores de los genes a transcribir. La *metilación y acetilación de restos lisina* y otras modificaciones covalentes (fosforilación, ubicuitinación) de las histonas tiene un papel en la regulación de los nucleosomas.

Modificación de la actividad de genes específicos. Los genes contienen *elementos de respuesta*; secuencias reconocidas por proteínas reguladoras (algunas inductoras, otras represoras) que se unen a ellas y modifican la actividad de transcripción. Muchas hormonas actúan a través de mecanismos de este tipo. En el caso de proteínas represoras, su unión al ADN suele bastar para silenciar al gen. En cambio, proteínas activadoras, además de fijarse al ADN, deben interactuar con la ARN polimerasa u otros factores de transcripción.

Las acciones se ejercen en secuencias ubicadas en distintos sitios de la misma molécula de ADN, denominadas secuencias de *acción cis* (en inglés *cis-acting*). A estas pertenecen los *promotores*, como las cajas TATA, CAT, GC y otras ubicadas antes del comienzo de la porción codificante del gen ("corriente arriba"). La unión a estas secuencias de diversos factores, entre ellos la proteína de unión a la caja TATA, subunidad componente de factores de transcripción, asegura su eficiencia.

La expresión del gen puede ser activada o reprimida por acciones sobre otras secuencias *cis*, como los potenciadores (enhancers), localizados en cualquier zona de la cadena de ADN, a veces separada por miles de bases del sitio de comienzo de transcripción. Algunos grupos de genes comparten secuencias reguladoras y pueden ser moduladas simultáneamente por los mismos factores.

Estructura de proteínas regulatorias. Diversas proteínas regulatorias de la actividad génica en eucariotas presentan aspectos estructurales relacionados con su función. Presentaremos los más importantes.

1. *Hélice-giro-hélice.* Es un dominio existente en proteínas reguladoras de procariotas, también presente en eucariotas. Está formado por dos hélices α unidas por un corto tramo al azar (figs. 23-1 y 23-2 A). Este tipo de dominio es llamado *hélice-giro-hélice*. El eje de cada hélice es más o menos perpendicular con respecto al de la otra. Una de las hélices, la de reconocimiento, se ubica en el surco mayor del ADN, donde puede detectar secuencias específicas y fijarse a ellas. La otra hélice queda en posición transversal con respecto a la dirección del surco (fig. 23-1). Estas proteínas, comúnmente dímeros, poseen dos dominios "hélice-giro-hélice" que se fijan del mismo lado de la molécula de ADN. Los dominios están separados por una distancia equivalente a una o dos vueltas de la doble hélice de ADN (fig. 23-1).

Probablemente la interacción de la proteína reguladora y el ADN depende del establecimiento de puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals entre cadenas laterales de restos aminoacídicos de la proteína y grupos funcionales en los pares de bases accesibles desde el surco mayor. Al unirse al ADN, los represores interfieren y los inductores favorecen la actividad de la ARN polimerasa dependiente de ADN. La adaptación mutua de proteínas reguladoras y doble hélice de ADN es fundamental para esta acción; de allí la

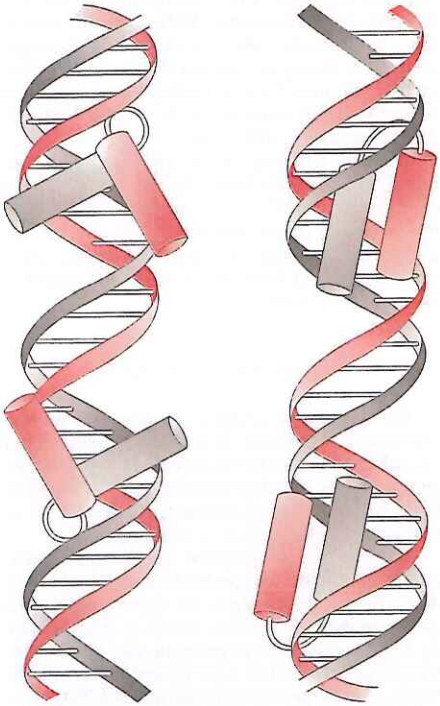


Fig. 23-1. Representación esquemática de la unión de dominios "hélice-giro-hélice" al ADN. Los cilindros grises corresponden a las hélices α que se introducen en el surco mayor e interaccionan con las bases en el fondo de éste. Se muestran los dominios "hélice-giro-hélice" pertenecientes a una proteína reguladora (no representada en su totalidad). A la izquierda, vista frontal; a la derecha, vista lateral.

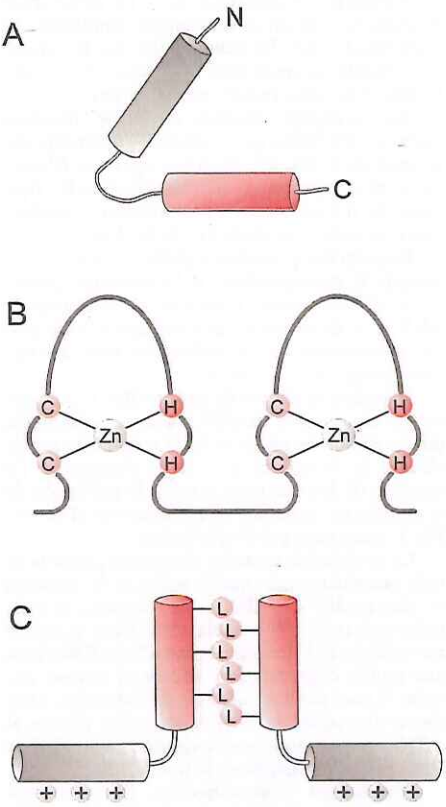


Fig. 23-2. Motivos estructurales comunes en proteínas reguladoras de la transcripción. **A.** Hélice-giro-hélice. **B.** Dedos de zinc (Zn: zinc; C: cisteína; H: histidina). **C.** Cremallera de leucina (L: cadena lateral de leucina). Los cilindros grises en **A** y **C** corresponden a hélices α que se unen al ADN.

importancia de los posibles cambios conformacionales de la molécula de ADN (pág. 120).

2. *Dedos de zinc*. Este motivo estructural recibe su nombre por la conformación que adopta la cadena polipeptídica en una extensión de unos 30 aminoácidos. Un átomo de zinc establece enlaces de coordinación con dos restos cisteína y dos histidinas; el trozo peptídico que media entre esos restos adopta la forma de dedo (fig. 23-2 B). En las proteínas regulatorias de este grupo suelen encontrarse de 2 a 13 "dedos". La unión de la proteína al ADN se realiza gracias a estas zonas de la cadena, que se ubican en los surcos de la doble hélice. Dentro de este tipo de proteínas se encuentran los receptores de esteroides.

3. *Cremallera de leucina*. Generalmente es una proteína dimérica en la cual cada subunidad posee un dominio con dos hélices. Una de las hélices tiene un resto leucina cada siete residuos; las cadenas laterales de las leucinas emergen hacia el mismo lado, separadas entre sí por dos vueltas de hélice. La otra hélice del dominio es rica en restos con cargas positivas y puede establecer interacciones con ADN. La subunidad se dimeriza con facilidad, ya que la hélice rica en leucinas se enfrenta con otra similar por interacciones hidrofóbicas. Algunos autores vieron en esta disposición cierta similitud con una cremallera o "cierre relámpago", de la cual deriva su nombre (en inglés *leucine zipper*) (fig. 23-2 C).

Mediador. Recientemente se ha demostrado la existencia de un gran complejo multiproteico (constituido por 30 subunidades en humanos) que cumple un papel muy importante en la regulación de la transcripción en eucariotas.

Este complejo, llamado *mediador*, funciona como un adaptador que conecta los diversos integrantes de la maquinaria transcripcional (Potenciadores o Represores - ARN polimerasa II - Factores de transcripción - Promotores) y asegura una adecuada comunicación entre ellos.

Regulación postranscripción. Puede ocurrir durante el procesamiento del transcripto primario (ARN precursor) y durante el transporte de ARNm desde el núcleo al citoplasma. Varios de los mecanismos de modificación postranscripción pueden ser regulados.

Regulación a nivel de traducción. La síntesis de proteínas sobre mARN puede ser controlada por proteínas de unión a ARN a nivel de la iniciación de la traducción y de la elongación. La mayoría de los controles afectan la iniciación de la síntesis de proteínas particularmente el factor-FIe-2, inactivado por fosforilación.

La cantidad de proteína sintetizada puede también controlarse por modificación de la duración o "vida media" del ARNm. La presencia de múltiples copias de la secuencia AUUUA en la región no codificante 3' terminal "marca" al ARNm para una rápida degradación y reduce el tiempo durante el cual puede funcionar la traducción. Otra forma de control se realiza por unión directa al ARNm de proteínas que bloquean la actividad de factores que participan en la traducción.

Regulación postraducción. Las proteínas sintetizadas en la célula tienen una vida media que varía entre horas y días para algunas y entre meses y años para otras. Finalizada su vida útil, la proteína es degradada por proteasas lisosomales o citosólicas (ver pág. 328). La intensidad de esta proteólisis contribuye también a regular la cantidad de una proteína determinada existente en la célula en un momento dado.

Papel del ARN no codificante

La evidencia reciente indica que, aparte del ARNm, el ARNr y el ARNt, el transcriptoma incluye otros ARN que se dividen en dos clases según su tamaño: los pequeños y los largos no codificantes. Los primeros incluyen los micro ARN (miARN), los ARN pequeños de interferencia (siRNA, del inglés *small interfering RNA)*, ARN nuclear pequeño, que participa en el proceso de *splicing*, ARN que interactúa con proteína PIWI (piRNA, del inglés PIWI interacting RNAs) y es represor de transposones, ARN pequeños asociados a promotores, ARN iniciadores de transcripción, ARN pequeños circulares, que pueden interactuar con miARN). Se estima que existen más de 9.000 ARN pequeños y de 10.000 a 30.000 ARN largos no codificantes.

Muchos transcriptos de ARN compiten por unirse a miARN. Se habla de ARN competidores endógenos (ceARN). La comprensión de estas interacciones puede llevar a un mejor conocimiento de las redes de regulación génica comprometidas en el desarrollo y en la producción de alteraciones patológicas.

Interferencia por ARN

En vegetales y animales se describió un mecanismo de regulación de la actividad génica por el cual se silencia selectivamente la expresión de genes, ya sea por degradación del ARN mensajero (ARNm) correspondiente, inhibición de su traducción, o bloqueo de la transcripción.

Inicialmente se propuso que este mecanismo de inhibición, denominado *interferencia por ARN* (RNAi, de las siglas en inglés), representa un mecanismo de defensa contra la introducción de ADN anómalo en el genoma, que puede ocurrir por infección viral o por inserción de transposones, pero luego se comprobó que la RNAi es un mecanismo que participa en la regulación de gran parte de los genes integrantes del genoma.

Las moléculas comprometidas en RNAi se encuentran en muy diversos organismos (protozoarios, hongos, vegetales y animales, incluidos humanos), lo cual indica que su aparición ocurrió tempranamente en el curso de la evolución y fueron conservados.

La interferencia por ARN es desencadenada en las células por la formación de ARN de doble hebra pequeños (sRNA de *small RNA*) con secuencia similar (en la que T es reemplazada por U) a la de un segmento del gen a silenciar. El proceso es específico, diferente de la reacción antiviral general producida por ARN de doble hebra que estimula la liberación de interferón (pág. 688).

La interferencia por ARN es un proceso fisiológico, iniciado por ARN de doble hebra endógeno, es decir, producido en la misma célula, pero también puede ser provocado experimentalmente introduciendo RNA silenciador sintético en el citoplasma. Teóricamente es posible predecir que, utilizando RNA pequeño con la secuencia precisa, podría silenciarse cualquier gen. De allí el gran interés despertado por la RNAi, que brinda

una poderosa herramienta en estudios de la función génica.

Para introduccir miARN en las células y tejidos "blanco" se utilizan diversas estrategias: a) ARNs pequeños sintetizados químicamente, asociados a policationes, a colesterol, a sustratos de receptores de superficie de membrana, incluidos en nanopartículas que pueden penetrar en las células. b) ARN en horquilla vehiculizado por vectores virales que generan el miARN por transcripción en la célula blanco.

ARNs pequeños

Los *micro ARN* (miARN) son pequeñas moléculas de ARN no codificante, de alrededor de 22 nucleótidos, que regulan diversas funciones celulares. Se conoce la existencia de más de 2000 miARNs y es probable que este número continúe aumentando en el futuro.

Promueven la regulación postranscripcional o traduccional de gran cantidad de genes. Se calcula que el 60% de los genes que codifican para proteínas son modulados por miARN. Por esta razón, las alteraciones en las moléculas de miARN pueden provocar múltiples trastornos.

Entre los otros tipos de ARN pequeños se distinguen los siARNs y los piARN.

Los *siARNs* tienen como función principal silenciar genes extraños y transposones. Los *piARNs* son hebras de 24 a 31 nucleótidos. Son de una cadena; se unen a una proteína de la familia de las Argonautas llamada PIWI. Entre otras acciones, silencian transposones en células germinales.

Biogénesis de siARN. Los *ARN pequeños de interferencia* (siRNA, del inglés *small* o *short interfering RNA)* se generan a partir de ARN de doble hebra lineal producidos en la célula por infección viral, por elementos genéticos móviles (transposones), por transcriptos endógenos que pueden aparearse a otras hebras de ARN o ARN de doble cadena exógenos introducidos artificialmente en las células. Este ARN es procesado en el citoplasma por una ribonucleasa III llamada *Dicer* que lo secciona en trozos de 21 a 25 nucleótidos, en los cuales el extremo 3' de cada hebra excede en dos bases al extremo 5' de la otra, es decir, quedan dos bases no apareadas en los terminales 3' (fig. 23-3). Los extremos 5' son esterificados por un grupo fosfato. Estos segmentos poseen secuencia idéntica a la del gen "blanco o "diana".

Biogénesis de miARN. Son codificados por el genoma. Se originan por transcripción, catalizada por ARN polimerasa II o III, de trozos de ADN no codificante de proteínas localizados en intrones o en secuencias intergénicas. En humanos se han reconocido cientos de genes responsables de la síntesis de cadenas de ARN de una longitud de 100 a 200 nucleótidos con segmentos de secuencia autocomplementaria que permiten a la cadena volverse sobre sí misma para formar asas u horquillas con trozos de doble hélice. Estas horquillas son los miARN primarios (pri-miARN) (fig. 23-3).

El procesamiento de miARN comprende una etapa previa que se cumple en el núcleo, en el cual interviene un complejo proteico que contiene una endorribonucleasa llamada *Drosha* que produce cortes en el pri-miARN (este paso no está representado en la figura 23.3). Se forma el miARN precursor (pre-miARN).

El pre-miARN pasa al citoplasma donde la ARNasa *dicer* lo escinde, formando trozos linea-

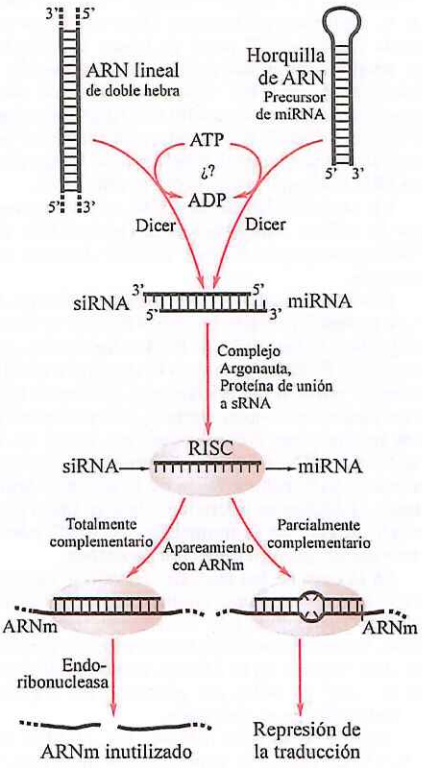


Fig. 23-3. Interferencia por ARN.

les de doble hélice de 21 a 30 nucleótidos, similares a los de siARN.

Una de las hebras de los miARN tienen una secuencia similar, no necesariamente idéntica, a la de un segmento del gen "blanco".

Si bien tanto los siARN como los miARN cumplen la función final de inhibir la expresión génica, hay diferencias en cuanto al origen y funciones de estas moléculas. Los siARN silencian genes extraños para evitar las perturbaciones del genoma que ellos pueden causar. Los miARN actúan en la regulación de la expresión de genes comprometidos en diversas funciones, como proliferación celular, hematopoyesis, apoptosis (pág. 703), etc.: en general, tienen relación con el crecimiento y desarrollo del organismo.

Formación del RISC. A continuación, tanto miARN como siARN forman un complejo con diversas proteínas. La incorporación de los ARN pequeños al complejo requiere la presencia del grupo fosfato y del excedente de dos nucleótidos en los extremos 5' y 3' respectivamente. Como producto de la escisión catalizada por Dicer se genera una doble cadena de 22 pares de bases. Este dúplex se acopla a proteínas designadas *Argonauta*; la hebra del pre-miARN total o parcialmente complementaria de un segmento del ARN mensajero (ARNm) "blanco" es separada, probablemente por acción de una enzima tipo helicasa; se forma así el miARN maduro. La otra hebra es eliminada.

La especificidad de la ARNi es determinada por la cadena complementaria (antisentido) del ARNm transcripto del gen "blanco", llamada hebra guía.

Con la asociación a otras proteínas además de la Argonauta, miARN y siARN forman el Complejo silenciador RISC (de *RNA induced silencing complex*). El RISC acomoda el miARN o siARN sobre la porción del ARNm con secuencia total o parciamente complementaria. Si las secuencias son exactamente complementarias, como en el caso del siARN, el apareamiento es perfecto y se activa la endorribonucleasa de la proteína Argonauta, el ARNm es liberado en trozos, inútil para servir de guía en la traducción. El RISC puede entonces atacar otra molécula de ARNm.

En el caso de los miARN, cuando la secuencia es sólo parcialmente complementaria de la del ARNm "blanco", el apareamiento es menos perfecto. En estas condiciones no se produce hidrólisis sino cambios en el ARNm, como eliminación de la "cola" de poliA por ejemplo, que impiden su traducción en el ribosoma.

Aunque en su gran mayoría los miARN inhiben la expresión de genes, se han mencionado casos en los cuales la modifican positivamente.

Las dos etapas de hidrólisis, de pri-miARN por Drosha y de pre-miARN por Dicer, principales sitios de la biogénesis del miARN, son cuidadosamente reguladas por diferentes factores. La falla de esos procesos de regulación puede ocasionar alteraciones en el miARN que afectan su actividad.

Se ha demostrado que los miARNs, a través de su acción sobre la expresión génica, participan en la modulación de un amplio espectro de procesos fisiológicos, como los relativos a la proliferación, migración y diferenciación celular, apoptosis, senescencia, respuesta inmune, metabolismo, gametogénesis, etc.; también contribuyen a mantener la estabilidad del genoma y la respuesta al estrés. Por esta razón, la desregulación de la biogénesis de miARN se ha reconocido como causa de condiciones patológicas que pueden afectar a diversos aparatos o sistemas, como el cardiovascular, respiratorio, digestivo, nervioso, inmunitario, etc. Numerosas pruebas indican la relación de miARNs con la producción de neoplasias malignas, metástasis y angiogénesis.

Las técnicas actuales permiten detectar la presencia de miARN anormales, y utilizarlos con fines diagnósticos o pronósticos en clínica. Se abre la esperanza de desarrollar procedimientos terapéuticos para prevenir el daño que puede provocar esta clase de moléculas anormales.

Las técnicas de interferencia por ARN tienen gran impacto en la investigación básica y ofrecen numerosas posibilidades de aplicación en medicina.

La RNAi está siendo probada como recurso terapéutico en muchas condiciones patológicas: enfermedad de Parkinson, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedades del aparato respiratorio, obesidad, artritis reumatoide, hipercolesterolemia, diabetes tipo 2, infección por HIV y distintos tipos de tumores malignos. Los resultados en animales de laboratorio han sido muy promisorios y en muchos casos se han autorizado pruebas clínicas en humanos.

ARN largo no codificante

Menos del 2% del genoma humano corresponde a genes que codifican proteínas; gran parte del resto es activamente transcripto en ARN no codificante. Los transcriptos de menos de 200 nucleótidos de extensión comprenden los ARN pequeños o cortos descriptos en la sección anterior. Los de más de 200 nucleótidos, sintetizados por ARN polimerasa II, son los llamados ARN largos no codificantes (lncRNAs, de *long non-coding RNAs*).

Si bien todavía no se conoce con exactitud su mecanismo de acción, hay evidencias que señalan a los lncRNAs como importantes reguladores de la actividad génica. Influirían sobre la modificación de histonas provocando condensación de la cromatina y así el bloqueo de la expresión de genes. Se han identificado lncRNAs que participan en la inactivación de uno de los cromosomas X que ocurre en células femeninas de mamíferos. También participan en la regulación del ciclo celular, la apoptosis y la respuesta inmune. Los lncRNAs están comprometidos en diversos procesos patológicos, entre ellos la oncogénesis.

Riboswitches

Riboswitches son segmentos no traducibles de ARNm, de una extensión de 35 a 200 nucleótidos, que pueden cambiar su conformación cuando se unen a metabolitos, coenzimas de molécula pequeña o a iones y ejercen acción modulatoria sobre la actividad de genes. La estructura terciaria de estos segmentos o dominios del ARNm, llamados *aptámeros*, les permite servir como receptores específicos de un determinado ligando y fijarlo cuando su concentración en el medio alcanza cierto nivel. Frecuentemente cerca del aptámero existe otro dominio, denominado *plataforma de expresión*, el cual modifica su conformación habilitando al *riboswitch* para influir sobre elementos adyacentes del ADN que controlan la actividad de genes implicados en la formación del ligando. El efecto regulador puede ejercerse sobre la transcripción, el *splicing*, la estabilidad del ARNm o la traducción. En su mayoría tienen acción represora (efecto de retroalimentación negativa), pero algunos estimulan la expresión génica.

Inicialmente fueron demostrados en bacterias y se pensó que eran privativos de procariotas; por ejemplo, en el ARNm de enzimas de la vía de biosíntesis de tiamina (vitamina B_1), en *Escherichia coli* y en otros microorganismos, existen *riboswitches* con aptámeros que fijan tiamina y pueden regular su producción. Hay también evidencias de su presencia en eucariotas.

RESUMEN

Regulación de la expresión génica. Un factor importante para la expresión génica es la accesibilidad del ADN. Los principales efectos reguladores actúan sobre la transcripción. Existen proteínas que reconocen secuencias específicas en sitios promotores y potenciadores. Entre los motivos estructurales presentes en esas proteínas se han descripto hélice-giro-hélice, dedos de zinc y cremallera de leucina. La actividad génica puede también ser regulada a otros niveles además del de transcripción. Otras moléculas, como ARNs pequeños y largos, también participan en la regulación génica.

Interferencia por ARN. Es un proceso que silencia selectivamente la expresión de genes. Se activa por la presencia de ARN lineal de doble hebra o en asa con secuencia similar a la del gen a silenciar. Una enzima llamada dicer secciona esos ARN en trozos de unos 22 nucleótidos, los pequeños ARN de interferencia (siRNA), que se unen a un complejo RISC y se fijan a ARNm complementario, al cual degradan o impiden su traducción.

BIBLIOGRAFÍA

Conaway R.C., Sato S., Chieri T.S., Tingtin Y., Conaway J.W. (2005). The mammalian mediator complex and its role in transcriptional regulation. *Trends in Biochemical Sciences*, 30: 250-255.

Eggleston A., Eggleston A.K. (Ed.) (2004). RNA interference. *Nature*, 431: 337-378.

Eggleston A.K. (Ed.) (2009). RNA silencing. *Nature*, 457: 395-434.

Kong J., Lasko P. (2012). Translational control in cellular and developmental processes. *Nature Reviews. Genetics*, 13: 383-394.

Kung J.T., Colognori D., Lee J.T. (2013). Long non-coding RNAs: past, present and future. *Genetics*, 193: 651-669.

Serganov A., Patel D.J. (2007). Ribozymes, riboswitches and beyond: regulation of gene expression without proteins. *Nature Reviews Genetics*, 8: 776-790.

Serganov A., Nudler E. (2013). A decade of riboswitches. *Cell*, 152: 17-24.

Sunk K., Lai E.C. (2013), Adult specific functions of animal micro-RNAs. *Nature Reviews Genetics*, 14: 535-548.

Tay Y., Rinn J., Pandolfi P.P. (2014). The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition. *Nature*, 505: 344-352.

CAPÍTULO 24

Modificaciones postraducción de proteínas

Plegamiento de proteínas

En el capítulo 3 se ha destacado la relación existente entre la conformación de la molécula de una proteína y su función. La cadena polipeptídica sintetizada como una larga hebra de aminoácidos debe plegarse sobre sí misma y adquirir la conformación adecuada para su actividad biológica. El sentido y el tipo de esos plegamientos están predeterminados en la estructura primaria; en otros términos, el mensaje genético contenido en el ARNm, indicando la secuencia u ordenamiento lineal de los aminoácidos, es el principal determinante de la disposición tridimensional que finalmente adopta la proteína. Esta disposición, o estado "nativo" de la proteína, casi siempre corresponde a la estructura de menor energía y, por lo tanto, más estable desde el punto de vista termodinámico. Algunas proteínas alcanzan su conformación final después de ser modificadas por procesos postraducción.

En general, el plegamiento se inicia por interacciones de algunos grupos hidrofóbicos, y también de grupos polares, que inducen los primeros pliegues de la cadena polipeptídica para formar un "núcleo de condensación" sobre el cual se va disponiendo el resto de la molécula hasta adquirir su conformación definitiva.

Es de fundamental importancia que las proteínas alcancen su estructura tridimensional correcta. Los defectos en la conformación generalmente determinan trastornos funcionales (ver más adelante). Por esta razón existen sistemas de control de calidad del producto terminado, que pueden detectar fallas y disponer la degradación en proteasomas de las proteínas defectuosas.

Chaperonas. El proceso de plegamiento podría ocurrir espontáneamente por pruebas sucesivas entre las múltiples interacciones posibles, hasta encontrar la disposición adecuada; pero esto resultaría muy lento e ineficiente. En las células, en cambio, se realiza con rapidez gracias a la presencia de proteínas llamadas *chaperonas* (de *chaperon*, acompañante) que dirigen el plegamiento, lo guían y facilitan en todas sus etapas, al tiempo que impiden posibles perturbaciones causadas por interacciones improductivas.

Las chaperonas no aportan información adicional; en muchos casos se unen a la cadena polipeptídica naciente cuando aún no se ha desprendido del ribosoma, estabilizan las conformaciones intermedias que el polipéptido adopta antes de llegar a su estado final y previenen la adopción de formas anormales o agregaciones insolubles. Las chaperonas también estabilizan cadenas no plegadas dúrante su transporte desde el citosol hacia su destino final o intervienen en el ensamble de subunidades en proteínas oligoméricas.

Originalmente, muchas de las proteínas actualmente reconocidas como chaperonas fueron identificadas como *proteínas de shock térmico* (se las designa con las siglas HSP, del inglés *heat shock proteins*). Estas proteínas se expresan en células sometidas a elevadas temperaturas u otras formas de estrés ambiental. Se encuentran en procariotas y eucariotas; su función sería facilitar el plegamiento de proteínas parcialmente desnaturalizadas y también actúan en condiciones normales. Se han descrito varias familias de proteínas de shock térmico, Hsp 10, Hsp 60, Hsp 70 y Hsp90, con funciones de chaperonas. Se fijan a porciones no plegadas de cadenas polipeptídicas en forma-

ción y las estabilizan durante el proceso de traducción; finalizada la síntesis, se unen a segmentos cortos de la cadena y la mantienen desplegada en su transporte dentro de la célula.

Las Hsp 70, ampliamente distribuidas en todos los tejidos, son proteínas diméricas que se unen a sus sutratos por interacciones hidrofóbicas. Cuando están unidas a ATP su afinidad por la proteína acompañada es baja; al hidrolizarse el ATP la afinidad aumenta. Las Hsp 70 son reguladas por otras proteínas que estimulan la actividad ATPasa o favorecen la liberación de ADP después de la hidrólisis; esto modula el grado de asociación chaperona-proteína.

Las Hsp 60 forman complejos multiméricos asociados a Hsp 10. Estos complejos reciben el nombre de *chaperoninas*, de las cuales se han descrito dos tipos: el complejo GroEL, asociado a GroES, presente en bacterias, mitocondrias y cloroplastos, y TCP1 (del inglés T-complex protein 1) en el citosol de eucariotas.

El complejo GroEL (Hsp 60) está constituido por dos anillos de siete subunidades cada uno. Ambos anillos se adosan para formar un tubo; GroES (Hsp 10) es otro polímero de siete subunidades. La asociación de GroEL y GroES es dependiente de la hidrólisis de ATP. Las chaperoninas TCP 1, presentes en citoplasma de eucariotas, están formadas por dos anillos de ocho subunidades cada uno.

Las chaperoninas forman parte de una clase de macrocomplejos proteicos a los cuales también pertenecen los proteasomas (pág. 328). Forman estructuras huecas dentro de las cuales se mantienen "secuestradas" las cadenas polipeptídicas sustrato mientras experimentan sus plegamientos en el caso de las chaperoninas, o su degradación a oligopéptidos en el caso de los proteasomas.

Patologías por plegamiento defectuoso de proteínas

Las proteínas incorrectamente plegadas que escapan a los controles de calidad, o desbordan la capacidad de degradación de los proteasomas, pueden formar agregados intra- o extracelulares con acción tóxica para el tejido en el cual asientan. En general, estos agregados tienen una estructura fibrilar, con predominio de láminas β.

Se suele llamar *amiloide* al material acumulado extracelularmente y *amiloidosis* a la condición patológica provocada por esa acumulación. Existen amiloidosis sistémicas, que afectan simultáneamente a diversos tejidos, y otras limitadas a un solo órgano. Se han descrito muchos ejemplos de ambos tipos de procesos. Entre las circunscriptas a sistema nervioso central mencionaremos algunas enfermedades neurodegenerativas.

En la *enfermedad de Alzheimer* hay acumulación extracelular de amiloide β, un péptido de 4,3 kDa producido por hidrólisis de la *proteína precursora de amiloide* en cerebro. Se forman placas y haces fibrilares que comprometen la función y viabilidad de las neuronas. También se observan agregados intracelulares de una proteína llamada *tau*.

En la *enfermedad de Parkinson* se producen depósitos filamentosos de la proteína *sinucleína* α (cuerpos de Lewy) en neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas.

Otro grupo de enfermedades neurodegenerativas causadas por proteínas defectuosamente plegadas es debido a mutaciones que determinan la síntesis de proteínas con su cadena alargada por repeticiones en tándem de glutaminas. Se forman agregados en núcleo y citoplasma de neuronas. En este grupo se encuentran la *enfermedad de Huntington* y varios cuadros de *ataxia espinocerebelosa familiar*.

Interesantes ejemplos de procesos neurodegenerativos causados por proteínas mal plegadas son las enfermedades por *prion*, que incluyen la *enfermedad de Creutzfeldt-Jakob* en humanos, el *scrapie* en ovinos y caprinos y la *encefalopatía espongiforme bovina* o "mal de la vaca loca". Todas son producidas por *priones*.

Prion. La proteína normal *prion*, designada con las siglas PrP^c, es una sialoglicoproteína inserta en la cara externa de membranas celulares, anclada con glicosilfosfatidilinositol. Existe en muchos tipos celulares, pero es más abundante en neuronas, especialmente en membranas pre- y postsinápticas. No se conoce su función. En su estructura predominan las hélices α.

Esta proteína puede sufrir un cambio de conformación para dar la proteína anómala llamada PrP^{sc}, resistente a la acción de proteasas, con predominio de láminas β. La PrP^{sc} tiende a formar agregados que, en el cerebro, determinan una degeneración progresiva, fatal.

La conversión de PrP^c en PrP^{sc} muy raramente ocurre en forma espontánea; es favorecida por la existencia de cierto tipo de mutaciones. Por esta razón, algunos de los casos de enfermedades relacionadas con PrP^{sc} tienen probabilidad de ser hereditarios.

Pero el hecho más llamativo es que PrP^{sc} actúa también como agente infeccioso. En bovinos se transmite en forma epidémica por ingestión de alimentos contaminados con la proteína anómala. Teóricamente, los humanos pueden también adquirirla en esa forma.

tivas al polipéptido; su significación funcional varía de unas proteínas a otras. Cumple un papel esencial en la regulación de la actividad de numerosas enzimas. Es un proceso reversible; existen fosfatasas que desprenden los restos fosforilos.

La caseína de la leche tiene muchos grupos serina fosforilados que unen Ca^{2+}. La proteína resulta así un excelente proveedor de nutrientes esenciales como Ca, P y aminoácidos.

Adición de hidratos de carbono. Las glicoproteínas se forman por adición de cadenas laterales de carbohidratos (en general, oligosacáridos) a restos asparragina, serina o treonina (pág. 283).

Adición de lípidos. La inserción de lípidos a la cadena polipeptídica en muchos casos sirve para anclarla en la membrana plasmática. Miristoilación, palmitoilación e isoprenilación son comunes en proteínas asociadas a la faz citosólica de la membrana. La adición de glicolípidos (glicosilfosfatidilinositol) es importante en proteínas fijadas a la cara externa de membrana plasmática.

Hay una observación interesante: si se impide la isoprenilación del oncogén *ras*, su capacidad carcinogénica desaparece.

Adición de grupos prostéticos. Por ejemplo, el grupo hemo de hemoproteínas y la biotina de carboxilasas son agregados después de la síntesis de la proteína y de su total liberación del ribosoma.

ADP-ribosilación

Durante mucho tiempo se pensó que todas las funciones de la coenzima NAD estaban relacionadas con su participación en reacciones de oxidorreducción, pero en los últimos veinte años comenzaron a acumularse evidencias que indican su participación en procesos genéricamente designados *ADP-ribosilación*, que cubren un muy amplio espectro de actividades.

En el NAD, la ruptura del enlace glicosídico entre el C1" de ribosa y el N1 de nicotinamida deja libres a ésta y al resto *ADP-ribosilo* (fig. 24-1). Éste puede unirse a una variedad de aceptores. Se conocen numerosas reacciones de transferencia de ADP-ribosa (*ADP-ribosilación*) dependientes de NAD; todas tienen gran importancia funcional.

Existen distintos tipos de reacciones que pueden ser consideradas variantes de la ADP-ribosilación: a) mono-ADP-ribosilación, b) poli-ADP-ribosilación, c) desacetilaciones dependientes de NAD, d) formación de ADP-ribosa cíclico, e) formación de ácido nicotínico-adenina dinucleótido fosfato (NAADP).

Mono-ADP-ribosilación. Es una modificación postraducción en la cual se transfiere ribosil-ADP del NAD a un resto aminoacil (arginina, cisteína, asparragina, histidina) de proteínas aceptoras. Es de hacer notar que en el NAD la unión de la porción ribosil-ADP a la nicotinamida es de alta energía; la ruptura de esa unión posibilita la reacción, catalizada por la *mono-adenosinadifosfato-ribosil transferasa* (ART). Fue inicialmente descrita dentro de las acciones ejercidas por toxinas bacterianas, pero después se la demostró también en células de eucariotas.

De las toxinas bacterianas, la del cólera promueve la transferencia de mono-ADP-ribosilo a la unidad α de proteínas G_s y las activan; se estimula la adenilciclasa, aumenta el nivel de AMP cíclico y se altera el funcionamiento de canales de transporte de iones en la membrana luminal de enterocitos, provocando diarreas muy graves, características de la infección colérica.

La toxina *pertussis* (de la bacteria que produce la tos ferina o convulsa) determina la ADP-ribosilación de restos cisteinilo de proteínas G y las desacopla de su receptor.

La toxina diftérica y la exotoxina de *Pseudomonas* detienen la síntesis de proteínas por ADP-ribosilación del Factor 2 de elongación.

Las toxinas de *Clostridium* ADP-ribosilan unidades de actina e impiden su polimerización.

Estas acciones muestran que la mono-ADP-ribosilación puede influir marcadamente en el funcionalismo de la proteína modificada.

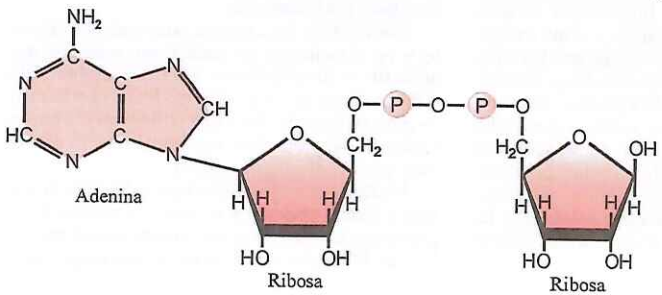


Fig. 24-1. ADP-ribosa.

Hasta ahora, los priones son los únicos patógenos transmisibles desprovistos de ácidos nucleicos y el primer caso conocido de una proteína de mamíferos que se comporta como agente infeccioso.

Se ha propuesto que la llegada de PrP^{sc} exógeno a los tejidos puede inducir a las moléculas normales de PrP^{c} a adoptar la conformación anormal. El proceso se propaga, dando lugar a la formación de los depósitos intracelulares responsables de la degeneración neuronal.

Modificaciones postraducción

Varias de las modificaciones postraducción de proteínas, especialmente las que refieren a histonas, pueden incluirse en los cambios epigenéticos mencionados en el capítulo anterior.

Formación de puentes disulfuro. Además de las chaperonas, otras proteínas contribuyen a determinar la conformación final de las cadenas polipeptídicas. En este sentido es muy importante la formación y ruptura de *puentes disulfuro* entre cisteínas, catalizada por *disulfuro isomerasa*. Cuando una hebra polipeptídica se pliega, restos cisteína originalmente alejados en el ordenamiento lineal de aminoácidos pueden quedar enfrentados. La oxidación catalizada por disulfuro isomerasa establece enlaces covalentes –S–S– intracatenarios, es decir entre cisteínas de la misma cadena. Estas uniones contribuyen en gran medida al mantenimiento de la estructura terciaria. Los enlaces disulfuro también se forman entre cisteínas de cadenas polipeptídicas diferentes (intercatenarios) en proteínas oligoméricas.

Isomerización de uniones peptídicas. Otro factor significativo en la estructura secundaria de una proteína es la disposición de las uniones peptídicas; en casi todas ellas la forma más favorable es la *trans*, excepto en las uniones que comprenden al aminoácido prolina. La *peptidil-prolil isomerasa* cataliza la isomerización *cis-trans* de esas uniones peptídicas.

Además, muchas proteínas recién sintetizadas adquieren sus propiedades funcionales características después de ser sometidas a otras modificaciones postraducción. Son numerosos los cambios de este tipo que experimentan las proteínas.

Cortes de la cadena polipeptídica. En eucariotas, todos los polipéptidos recién sintetizados poseen metionina como primer aminoácido; en procariotas, poseen N-formilmetionina. Este residuo, y a veces los dos o tres siguientes, son eliminados por hidrólisis catalizada por *peptidasas*. En algunos casos se escinden restos aminoacídicos del extremo C-terminal.

En moléculas transportadas a través de membranas, es frecuente la eliminación hidrolítica de segmentos del extremo N-terminal que actúan como secuencias señalizadoras. También se producen cortes en proteínas precursoras para obtener el producto final. Por ejemplo, a la preproinsulina, inactiva, se le eliminan dos trozos para obtener la insulina, con actividad hormonal (pág. 538). Muchos zimógenos, como tripsinógeno o quimotripsinógeno, se convierten en la enzima activa después de hidrólisis.

Algunos ARNm codifican para una cadena polipeptídica que después de su síntesis es escindida por proteasas específicas y genera varias proteínas diferentes. El polipéptido original es designado *poliproteína* (ej.: la proopiomelanocortina, pág. 514).

Modificación covalente. Después de la traducción, las proteínas son frecuentemente sometidas a adición o sustracción de grupos funcionales (hidroxilación, carboxilación, acetilación, metilación, amidación, desamidación, fosforilación, ADP-ribosilación) a cadenas laterales de aminoácidos. Estas modificaciones son importantes desde el punto de vista funcional.

Hidroxilación. En el colágeno, por ejemplo, numerosos restos prolina y lisina de la cadena original son sometidos a hidroxilación. Los derivados hidroxiprolina e hidroxilisina son muy importantes en la determinación de la conformación y propiedades de la proteína (pág. 49).

Carboxilación. El agregado de un carboxilo adicional a residuos glutamilo (γ-carboxilación) de proteínas (proteínas *gla*), por ejemplo, algunas de las comprometidas en el proceso de coagulación de la sangre (pág. 695). Esta modificación es catalizada por una enzima que requiere vitamina K (pág. 585); el glutamilo γ-carboxilado de las proteínas gla es quelante de Ca^{2+}, propiedad indispensable en la coagulación.

Acetilación. Catalizada por acetilasas, puede tener gran influencia en el comportamiento de muchas proteínas. Se calcula que, en el 50% de las proteínas de eucariotas, el grupo N-terminal es acetilado postraducción.

Metilación. En algunas proteínas del músculo y en citocromos se encuentran residuos monometil- y dimetil-lisina. La calmodulina (pág. 498) contiene un resto trimetil-lisina que es crítico para su función. En otras proteínas, los grupos carboxilo de glutamilos son metilados, lo que les hace perder su carga negativa.

Fosforilación. La fosforilación del hidroxilo de restos serina, treonina y tirosina, es catalizada por proteína quinasas que generalmente transfieren fosfato de ATP. Esta modificación agrega cargas nega-

En humanos se han reconocido varias enzimas de ADP-ribosilación. Algunas están fijadas por un ancla glicosil-fosfatidilinositol a la superficie externa de la membrana plasmática (*ectoenzimas*) y otras se encuentran dentro de las células (*endoenzimas*).

Llamó la atención el hallazgo de ectoenzimas que actúan sobre un sustrato (NAD) localizado dentro de las células. Se piensa que utilizarían NAD liberado al espacio intersticial por células lisadas y hasta se propuso la existencia, en la membrana plasmática, de canales que permitirían la salida de NAD.

Las ectoenzimas han sido funcionalmente asociadas a la modulación de la diferenciación de miocitos y otros procesos vinculados con la respuesta inmune e inflamatoria como quimiotaxis, reclutamiento de neutrófilos, inhibición de la citotoxicidad de células T y adhesión celular.

Las ART intracelulares están comprometidas en la regulación de sistemas de señales integradas por proteínas G que sirven de sustrato a las ART. La mono-ADP-ribosilación puede afectar la transmisión de señales y promover diversos efectos en las células. Se mencionan como resultantes de este tipo de modificación postraducción la inhibición de la traducción de proteínas, regulación de las funciones del aparato de Golgi, del citoesqueleto, etc.

Poli-ADP-ribosilación. Es otra modificación postraducción catalizada por *poli-adenosinadifosfato-ribosil polimerasas* (PARP). Se han identificado 18 genes para PARP, pero no todas las enzimas codificadas por esos genes han sido caracterizadas. Se están empezando a conocer las funciones de algunas de ellas.

Inicialmente las PARP fijan un ADP-ribosilo a residuos glutamilo o aspartilo de la proteína aceptora; luego continúan insertando unidades ADP-ribosilo en sucesión lineal mediante uniones glicosídicas 1"– 2'. Cada 40 o 50 unidades se crean puntos de ramificación en la cadena principal por enlaces 1"– 3'. Las PARP también pueden autopoli-ADP-ribosilarse. En efecto, uno de los principales sustratos de la enzima es ella misma.

Los polímeros de ADP-ribosas son altamente electronegativos y afectan notablemente las propiedades de las proteínas. La creciente carga negativa producida por la acumulación de grupos fosfato sobre la proteína modificada produce repulsión con otros polianiones, como el ADN, o atracciones a moléculas con carga positiva, como histonas.

De las ADP-ribosil polimerasas conocidas, algunas están localizadas en el núcleo. PARP-1 y PARP-2 son activadas por la presencia de sitios de corte en las hebras de ADN, a los cuales se unen. Esos cortes ocurren normalmente durante la replicación y la reparación del ADN, o pueden ser provocados por agentes externos. PARP-3 se encuentra con frecuencia asociada al centrosoma, PARP-4, a partículas de ribonucleoproteínas. PARP-7 y PARP-10 poli-ADP-ribosilan histonas. TNKS y TNKS-2, también poli-ADP-ribosil polimerasas, se relacionan con los telómeros.

La modificación mediante poli-ADP-ribosilación de determinadas regiones de proteínas básicas como las histonas altera las interacciones ADN-histonas y las atracciones intra- e internucleosomas, promoviendo la adopción de una estructura más laxa de la cromatina. Esto facilita el acceso al ADN de enzimas que participan en los procesos de replicación o reparación, como helicasa, topoisomerasas, polimerasas y ligasa.

La propia PARP autopoli-ADP-ribosilada tiende a repeler las hebras de ADN cercanas a medida que crece la carga electronegativa sobre ella misma y termina separándose.

Las PARP asociadas a los telómeros favorecen la intervención de la telomerasa y la elongación del cromosoma; además, su presencia sirve para repeler otras hebras de ADN e impedir alteraciones como translocaciones, fusiones extremo a extremo o recombinaciones deletéreas.

La poli-ADP-ribosilación de algunas enzimas puede modificar su actividad, por ejemplo, estimula a la ADN ligasa e inhibe a las endonucleasas, acción que permite prevenir la degradación de ADN.

A través de las acciones mencionadas, las PARP participan en la regulación de la estructura de la cromatina, de la transcripción, replicación, reparación y mantenimiento de la integridad del ADN, estimula la ADN ligasa del ADN; cuando la actividad de PARP está ausente o disminuida, aumenta la inestabilidad del genoma.

Las PARP asociadas al centrosoma contribuyen a la separación ordenada de las cromátidas durante la mitosis.

Algunas de las PARP intervienen también en la diferenciación celular, en la degradación de proteínas y en la regulación de la muerte celular programada (apoptosis, pág. 703). Los mecanismos de acción no son todavía bien conocidos. PARPs mediarían la apoptosis a través de señales proinflamatorias. Controlan la liberación desde las mitocondrias del factor inductor de apoptosis (AIF). Se ha demostrado relación entre poli-ADP-ribosilación y poli-ubicuitinación en la marcación de proteínas que han de ser degradadas.

En algunos casos de gran estrés celular, la sobreactivación de PARP puede llevar al agotamiento de las reservas de NAD y ATP, con conse-

cuencias devastadoras que terminan en necrosis de las células.

Estudios en animales de laboratorio han demostrado que cuadros isquémicos en cerebro y corazón, shock séptico u otras causas de inflamación severa mejoran cuando se inhibe a las PARP. Es probable que estas observaciones tengan aplicación en clínica, pero debe resolverse el problema que plantea la reducción de la actividad de ADP-ribosa-polimerasa, que lleva a inestabilizar el genoma, a permitir la acumulación de mutaciones y eventualmente a transformación maligna (carcinogénesis).

Los polímeros de ADP-ribosas son degradados por la *poli-ADP-ribosa glicohidrolasa*, que deja ADP-ribosas libres. Una *ADP-ribosa proteína liasa* libera la primera unidad fijada a la proteína. *Pirofosfatasas* separan AMP y ribosa fosfato.

Desacetilación dependiente de NAD. Existe una familia de *proteína-desacetilasas* dependientes de NAD a las cuales se las llama *sirtuinas* (SIRT). Pueden considerarse como una variante de ADP-ribosilasas, que liberan nicotinamida del NAD y utilizan acetato separado de proteínas como aceptor del ADP-ribosilo, para formar 2'-O-acetil-ADP-ribosa. Esta actividad fue originalmente observada en levadura y se la designó con las siglas SIR (de *silent information regulator*), después se la demostró en el nematodo *Caenorhabditis elegans* y en *Drosophila melanogaster*. En estos organismos se comprobó que su acción aumenta el tiempo de vida, especialmente en condiciones de restricción de nutrientes en el medio.

También se han encontrado sirtuinas en mamíferos, incluidos humanos, en los que la familia comprende siete miembros (SIRT-1 a SIRT-7). Actúan sobre diversos sustratos, como histonas, proteína p53, factores de transcripción, factor nuclear κB, etc.

La desacetilación de histonas hace que la cromatina adquiera una estructura más compacta, lo que promueve el silenciamiento de genes y protege zonas críticas de los cromosomas, como telómeros y centrosomas.

La proteína p53, importante para la estabilidad genómica, ya que controla el ciclo celular, la reparación de ADN y la apoptosis. La desacetilación de p53, al parecer, aumenta su estabilidad bloqueando la ubicuitinación.

SIRT 1 también está comprometida en el metabolismo energético, en la respuesta al estrés oxidativo, la protección del endotelio vascular y nervios en diferentes condiciones patológicas.

La nicotinamida liberada en las desacetilaciones dependientes de NAD actúa como un potente inhibidor de la actividad de sirtuinas y contribuye a su regulación.

Como en algunos organismos la acción de las sirtuinas contribuye a la prolongación de la vida, se ha pensado que podría ser un factor pro-longevidad en otros seres. Aún no se tienen evidencias suficientes para extrapolar esos resultados a animales superiores.

En virtud de las acciones de poli-PARP-polimerasas y sirtuinas, se cree que el mantenimiento de niveles normales en las células puede prevenir o retardar la carcinogénesis y alteraciones relacionadas con el envejecimiento.

El producto 2'-O-acetil-ADP-ribosa resultante de la actividad de sirtuinas podría tener funciones propias; se ha propuesto que actuaría como segundo mensajero.

Otros. Reacciones que no tienen relación con la modificación postraducción de proteínas, pero pueden considerarse variantes de la ADP-ribosilación, generan compuestos de importante acción fisiológica: ADP-ribosa cíclico y ácido nicotínico-ADP-ribosa fosfato (NAADP) (ver pág. 594).

Sumoilación

Una modificación postraducción descrita en los últimos años es la adición de una proteína pequeña similar a la ubicuitina (pág. 328), designada con las siglas SUMO (de *small ubiquitin-like modifier*), que se inserta en restos lisina de numerosas proteínas, produciendo cambios notables en sus propiedades.

SUMO tiene una masa de unos 10 kDa y es semejante a la ubicuitina en estructura terciaria, aunque presenta con ella menos del 20% de secuencias homólogas. En humanos se han identificado cuatro genes que codifican proteínas SUMO; éstas se expresan en muchos tejidos, sintetizadas como un producto inmaduro al cual se le debe escindir un trozo del extremo C-terminal para que adquiera capacidad de unirse a las proteínas "blanco".

La sumoilación consiste en la formación de un enlace tipo peptídico entre la glicina C-terminal de la proteína modificadora y el grupo ε-amina de un resto lisina de la proteína aceptora. A semejanza de la ubicuitinación (pág. 328), el proceso requiere una cascada enzimática de tres tipos de catalizadores: activador (E1), conjugante (E2) y ligasa (E3). En la mayoría de los casos se produce adición de sólo una unidad de SUMO, pero se ha observado también la formación de cadenas de poli-SUMO. Las reacciones mencionadas son re-

versibles; el modificador puede ser separado por una hidrolasa.

Si bien hay similitudes entre los procesos de ubicuitinación y sumoilación, las consecuencias de ambos son muy diferentes. La ubicuitina primariamente marca el sustrato para su degradación, mientras la sumoilación resulta en diversas modificaciones funcionales.

Las proteínas aceptoras de SUMO se encuentran en diferentes sitios de la célula, núcleo, citoplasma, retículo endoplásmico o membrana plasmática. Los resultados de la sumoilación son muy variados. El efecto básico más general involucra a las interacciones intra- o intermoleculares del sustrato. Produce cambios en la superficie o la conformación de la proteína que alteran sitios de contacto con otras macromoléculas. También puede modificar la localización subcelular de la proteína, reprimir o favorecer su degradación, inhibir o activar enzimas, afectar la estabilidad genómica o cromosomal, la organización de la cromatina, influir la reparación de ADN y en sistemas de transducción de señales, etc. El resultado de estas acciones, a veces contradictorias, depende específicamente de la proteína modificada. Numerosos factores de transcripción son comúnmente aceptores; algunos resultan activados y otros inhibidos. A veces el efecto es condicionado por otros procesos experimentados por el sustrato, como fosforilación, acetilación, metilación, etc.

Es posible que la sumoilación juegue un papel en la regulación de funciones metabólicas básicas; también se ha mencionado su posible participación en la adaptación de las células a situaciones de estrés, como la hipoxia. La probable relación con defectos del desarrollo y distintas enfermedades, como cáncer, trastornos neurodegenerativos y otros es tema de recientes estudios.

Nucleotidación es otro tipo de modificación postraducción, catalizada por enzimas designadas con las siglas Fic (de *filamentation induced by cAMP*), que han sido demostradas en bacterias y también en humanos. Estas enzimas se han conservado a lo largo de la evolución.

Fic agrega AMP, UMP, y también fosfocolina, a hidroxilos de cadenas laterales de aminoácidos en muchas proteínas y modula su funcionamiento.

Entre los sustratos de Fic figuran GTPasas de la familia Rho, que desempeñan importante papel en transducción de señales.

Bacterias patogénicas utilizan esta enzima para alterar sistemas de señales del hospedador durante la infección.

Tránsito de proteínas en la célula

La síntesis de proteínas se realiza en el citoplasma (excepto las elaboradas por las mitocondrias). Desde allí cada proteína debe dirigirse al sitio donde cumplirá sus funciones. Algunas permanecen en el citosol, pero la mayoría tiene otros destinos: diferentes organelas, distintas membranas o el espacio exterior (secreciones). El tránsito de proteínas desde el lugar de origen hacia su destino final requiere un sistema de señalización, capaz de asegurar que cada molécula encuentre el camino correcto.

Frecuentemente las señales son parte de la propia estructura de las moléculas en tránsito. Un segmento de la cadena polipeptídica de extensión variable (de 10 a 60 aminoácidos) contiene una secuencia especial indicadora del sitio de destino; este trozo es designado *péptido señal* y puede estar localizado en el terminal N, en posiciones internas de la cadena o, más raramente, en el terminal C.

La síntesis comienza siempre en ribosomas libres en el citoplasma y puede seguir dos vías principales: 1) los ribosomas continúan en el citoplasma. Una vez completada la cadena polipeptídica, ésta se libera en el citosol; 2) los ribosomas son atraídos hacia la membrana del retículo endoplásmico (RE) y la cadena polipeptídica es transferida a las cavidades o cisternas del RE a medida que se sintetiza.

1. La primera vía comprende a las proteínas citosólicas y a las destinadas a núcleo, mitocondrias y peroxisomas. Las proteínas sin señales específicas permanecen en el citosol. Las moléculas destinadas a organelas poseen un *péptido señal*. En las exportadas al núcleo la señal de reconocimiento es un tramo corto de 4 a 8 residuos, rico en aminoácidos con carga positiva (lisina y arginina), localizado en cualquier parte de la cadena. Esta porción habilita a la proteína para ingresar por los poros de la membrana nuclear.

Los polipéptidos transferidos a mitocondrias tienen en el terminal N un péptido señal de 20 a 60 aminoácidos rico en restos con carga positiva. En cada una de las dos membranas (externa e interna) de las mitocondrias existen complejos proteicos encargados de la translocación de polipéptidos. El pasaje a través del canal formado por estos complejos requiere energía (ATP) y también un gradiente eléctrico. La cadena debe mantenerse desplegada. Una vez en el interior de la mitocondria, una peptidasa secciona el segmento señal. La proteína puede permanecer en la matriz, insertarse en la membrana interna o volver al espacio intermembrana. En los dos últimos

casos, un segmento hidrofóbico interno dirige la reinserción de la cadena en la membrana interna. La proteína puede quedar fijada a ésta como proteína integral, o pasar al espacio intermembrana. La cadena polipeptídica que ha alcanzado su destino final experimenta los plegamientos que le darán su conformación normal. En este proceso participan chaperonas de la familia Hsp70.

2. La segunda alternativa incluye a las proteínas inicialmente introducidas en el RE, que pueden quedar en el lumen de las cisternas del RE, o pasar al aparato de Golgi y posteriormente a lisosomas, a membrana plasmática o al exterior de la célula (secreción) (ver pág. 222). Todas tienen un péptido señal rico en aminoácidos hidrófobos en el extremo N-terminal, también llamado *péptido líder*. Poco después de iniciada la síntesis, cuando esta secuencia emerge del ribosoma, es reconocida por partículas citoplasmáticas de naturaleza ribonucleoproteica, designadas *partículas de reconocimiento de la señal* (PRS), que conducen al complejo de síntesis hacia la membrana del RE, donde existen receptores específicos para las PRS. El ribosoma se une a la membrana del RE sobre complejos proteicos transmembrana que forman el sistema de translocación. La fijación de gran número de ribosomas a esta membrana otorga su aspecto característico al llamado *retículo endoplásmico rugoso*, en contraposición con el *RE liso*, que no posee ribosomas adosados.

Mientras la PRS está unida al péptido líder, la elongación de la cadena peptídica se hace más lenta o se detiene. Cuando el ribosoma se fija a la membrana del RE, se separa la PRS y la síntesis retoma su actividad inicial; el péptido líder penetra en el canal del sistema de translocación y se fija en él; el resto de la cadena en crecimiento es impulsado hacia el lumen del RE (figs. 11-5 y 24-2) y una *peptidasa de la señal* secciona la secuencia líder, aun antes de finalizada la síntesis de la cadena polipeptídica. Después de este primer procesamiento, la proteína queda libre en la luz del RE y puede permanecer en ella o continuar su camino hacia el aparato de Golgi. La vía seguida depende de segmentos señalizadores existentes en distintos sectores de la molécula. Muchas proteínas inician en la cavidad del RE el proceso de glicosilación (pág. 283); cuando ingresan en el aparato de Golgi lo hacen por el sector *cis*, encerradas en vesículas cuya membrana es un desprendimiento de la del RE. Esta membrana se fusiona con la del sistema de Golgi y en él libera su contenido. Nuevamente se ofrecen distintas alternativas para la proteína: permanecer en el Golgi, dirigirse a lisosomas, a membranas, o ser secretadas (pág. 222).

La N-glicosilación y la formación de puentes disulfuro en el RE tienen mucha importancia para el plegamiento de proteínas de membrana y proteínas secretadas.

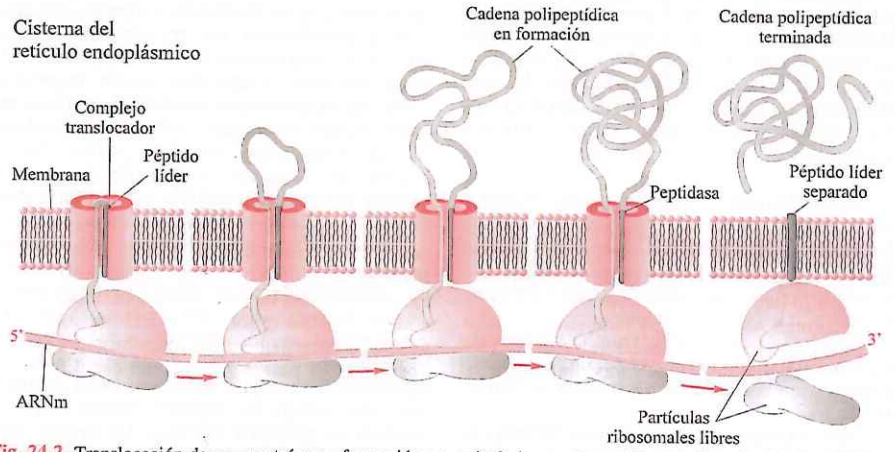


Fig. 24-2. Translocación de una proteína en formación a través de la membrana del retículo endoplásmico (RE). La porción inicial de la cadena polipeptídica, representada en gris oscuro, corresponde al péptido de señalización o líder (o *start transfer*); éste conduce a la hebra de proteína naciente a través de la membrana, hacia las cisternas del RE. El péptido líder es separado del resto por acción de una peptidasa.

Las proteínas destinadas a los *lisosomas*, predominantemente hidrolasas, son modificadas en el aparato de Golgi por un proceso enzimático que agrega fosfato en posición 6 de un resto manosa. La manosa-6-fosfato es reconocida por un receptor de membrana y la proteína se fija a éste. Se forman vesículas que se desprenden del Golgi, se dirigen a lisosomas y se fusionan con su membrana. Finalmente, el contenido de la vesícula es liberado en el interior de la organela.

Existe un defecto genético en el cual falta la fosfotransferasa que cataliza una de las reacciones de formación de la manosa-6-P marcadora; es la *enfermedad de células I* o *mucolipidosis II*. Las enzimas hidrolíticas no pueden penetrar en los lisosomas y son excretadas fuera de la célula. En consecuencia, se produce acúmulo de lípidos complejos y glicanos que no pueden ser catabolizados (págs. 285 y 319).

Las proteínas "de exportación" siguen la vía secretoria. Sintetizadas en ribosomas fijados a la membrana del retículo endoplásmico (RE) (pág. 482), penetran en la cavidad de éste donde sufren distintas transformaciones (corte del péptido señal, formación de puentes disulfuro entre cisteínas, adición de carbohidratos, etc.). Estas proteínas, encerradas en vesículas formadas por evaginación de la membrana del RE, son enviadas hacia el sector *cis* del aparato de Golgi, en cuyo interior se libera el contenido después de la fusión de las membranas. Dentro del Golgi las proteínas experimentan modificaciones adicionales como el remodelamiento de las cadenas hidrocabonadas y el agregado de nuevos azúcares, lo que se conoce como glicosilación compleja. Luego de pasar por las distintas cisternas del sistema, las proteínas son empaquetadas y parten en vesículas que emergen de la red *trans* del Golgi. Estas vesículas cargadas se dirigen selectivamente a la membrana plasmática o a la de alguna organela, principalmente lisosomas.

En el proceso descrito intervienen diversos factores que dirigen la formación de vesículas, aseguran el reconocimiento del sitio de destino y promueven la fusión de las membranas (ver pág. 224).

RESUMEN

Acciones postraducción. La cadena polipeptídica debe plegarse sobre sí misma para adquirir su estructura adecuada. El plegamiento es asistido por *chaperonas*, comúnmente proteínas de shock térmico. También participan complejos multiméricos que forman estructuras huecas, las *chaperoninas*. Otras acciones postraducción son: eliminación del residuo metionina N-terminal, formación de puentes disulfuro entre cisteínas, modificaciones covalentes diversas: hidroxilación, carboxilación, acetilación, metilación, amidación, desamidación, fosforilación, ADP-ribosilación, adición de oligosacáridos, adición de grupos prostéticos, sumoilación.

Mal plegamiento de proteínas. Proteínas incorrectamente plegadas pueden formar agregados intra- o extracelulares de estructura fibrilar, con acción tóxica (ej.: distintos cuadros de amiloidosis y enfermedades neurodegenerativas). *Priones* son proteínas mal plegadas que se comportan como agentes infecciosos ("mal de la vaca loca").

Tránsito de proteínas en la célula. Se requiere señalización que dirija la proteína recién sintetizada hacia su destino final. Las señales residen en su propia estructura. Las proteínas que se liberan en el citosol pueden permanecer en él o dirigirse al núcleo, mitocondrias o peroxisomas. Las destinadas al citosol no necesitan señal, las otras poseen segmentos de secuencias características. Las proteínas que se introducen en el retículo endoplásmico (RE) se aproximan y penetran en él guiadas por partículas de reconocimiento. La cadena polipeptídica penetra en el lumen, donde sufre modificaciones (glicosilación, formación de puentes disulfuro). Algunas quedan en el RE y otras pasan al aparato de Golgi en el cual se producen nuevas glicosilaciones y fosforilaciones. De allí parten las destinadas a lisosomas, a la membrana plasmática o las finalmente secretadas al espacio extracelular. Todo se realiza por transporte vesicular, en el que intervienen proteínas específicas.

BIBLIOGRAFÍA

Choiti F., Dobson C.M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid and human disease. *Annual Review of Biochemistry*, 75: 333-366.

DeArmond S.J., Prusiner S.B. (2003). Perspectives on prion biology, prion disease pathogenesis and pharmacologic approaches to treatment. *Clinicas in Laboratory Medicine*, 23: 1-41.

Deuerling E., Bukau B. (2004). Chaperone-assisted folding of newly synthesized protein in the cytosol. *Critical Review of Biochemistry and Molecular Biology*, 39: 261-277.

Floho A., Melchior F. (2013). Sumoylation: A regulatory protein modifications in health and disease. *Annual Review of Biochemistry*, 82: 357-385.

Fridman J. (2001). Folding of newly translated proteins in vivo. The role of molecular chaperones. *Annual Review of Biochemistry*, 70: 603-649.

Geiss-Friedlander R., Melchior F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8: 947-956.

Gonfloni S., Iannizzotto V., Maiani E., Bellusci G., Ciccone S., Diederich M. (2014). P5e and Sirt1: Routes of metabolism and genome stability. *Biochemical Pharmacology*, 92: 149-156.

Mandal M., Breaker R.R. (2004). Gene regulation by riboswitches. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5: 451-463.

Selkoe D.J. (2003). Folding proteins in fatal ways. *Nature*, 426: 900-904.

Smith A. (Ed.). (2003). Protein misfolding. *Nature*, 426: 883-909.

Westaway D., Carlson G.A. (2002). Mammalian prion proteins: enigma, variation and vaccination. *Trends in Biochemical Sciences*, 27: 301-307.

Yi J., Luc J. (2010). SIRT 1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804: 1648-1689.

Zhao J. (2007). Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64: 3017-3033.

CAPÍTULO 25

Bases bioquímicas de la endocrinología (I). Receptores y transducción de señales

La modulación de la actividad de enzimas por medio de efectores alostéricos y la regulación de la actividad génica en respuesta a estímulos del ambiente son procesos aptos para asegurar la adecuación funcional de los sistemas metabólicos en organismos unicelulares. En los pluricelulares, en cambio, los niveles de organización y la complejidad estructural aumentan en grado tal que aquellos mecanismos resultan insuficientes, por sí solos, para establecer una efectiva integración funcional.

Paralelamente al desarrollo de órganos y tejidos altamente diferenciados, surgió la necesidad de disponer de sistemas de comunicación y "control remoto", a fin de adaptar la actividad de cada célula a las necesidades del organismo y promover su funcionamiento como una unidad integrada. Esta misión está a cargo de los sistemas nervioso y endocrino.

Pese a las diferencias funcionales y estructurales entre ambos, actúan a través de un mecanismo básico similar: la secreción de intermediarios químicos o moléculas mensajeras que desencadenan una respuesta definida de sus células efectoras.

El sistema endocrino está constituido por una gran diversidad de células, agrupadas en glándulas discretas o dispersas en distintos tejidos, que elaboran y secretan productos activos. En muchos casos estos productos, denominados *hormonas*, se vierten en la circulación en respuesta a estímulos específicos. Vehiculizadas por la sangre, las hormonas llegan a las células efectoras (células "blanco" o "diana") en las cuales provocan un efecto determinado. También se secretan sustancias que no llegan a la sangre; actúan sobre la misma célula de origen (mecanismos *autocrinos*) o sobre células contiguas (mecanismos *paracrinos*). Entre éstos se cuentan *eicosanoides*, *factores de crecimiento* y *citoquinas* (estas últimas serán consideradas en el capítulo 29).

El sistema nervioso cumple la función de red de comunicaciones rápidas que conecta e interrelaciona los diversos componentes del organismo. La gran mayoría de las relaciones entre neuronas se cumple mediante la liberación en las sinapsis de compuestos llamados *neurotransmisores*. Pero el sistema nervioso no sólo actúa a través de neurotransmisores en los terminales sinápticos; también puede segregar hormonas.

Neuronas cuyos cuerpos se encuentran en núcleos del hipotálamo proyectan sus axones y tienen sus terminales en la hipófisis posterior o neurohipófisis, donde liberan *oxitocina* y *vasopresina*, hormonas que actúan sobre la glándula mamaria y el riñón respectivamente. Factores producidos en el hipotálamo, con acción reguladora de la secreción de hormonas en la hipófisis anterior o adenohipófisis, llegan a ésta a través de un rico sistema venoso porta que se extiende desde la eminencia media del hipotálamo.

Varios péptidos originalmente descriptos como hormonas del tracto gastrointestinal se producen también en el sistema nervioso. La médula adrenal vierte en la sangre adrenalina y noradrenalina, agentes que, además de su papel como hormonas, actúan como neurotransmisores en terminales adrenérgicos.

En la figura 25-1, se presentan sólo algunas de las múltiples interrelaciones e influencias recíprocas que permiten hablar de un *sistema neuroendocrino*.

Para completar el cuadro de integración, deben agregarse las interacciones de los sistemas

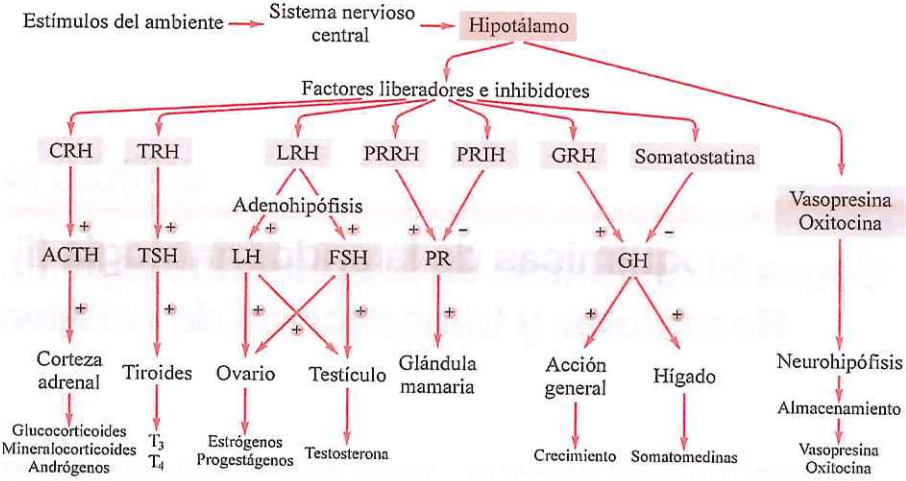


Fig. 25-1. Interacciones sistema nervioso-sistema endocrino. No se han representado acciones de retrorregulación o *feedback*. En general, el nivel de hormonas en sangre regula la liberación de la trofina correspondiente. *Hormonas liberadoras de hipotálamo*: CRH, liberadora de corticotrofina; TRH, de tirotrofina; LRH, de hormonas gonadotróficas (luteinizante y foliculoestimulante); PRRH, de prolactina; GRH, de somatotrofina (hormona de crecimiento); *Hormonas inhibidoras*: PRIH, de prolactina; Somatostatina, de hormona de crecimiento. *Hormonas de adenohipófisis*: ACTH, adrenocorticotrófica (corticotrofina); TSH, estimulante de tiroides (tirotrofina); LH, luteinizante; FSH, foliculoestimulante; PR, prolactina; GH, de crecimiento (somatotrofina); T_3 y T_4, hormonas tiroideas.

neuroendocrino e inmunitario (cap. 29). Así como el primero ejerce acciones regulatorias sobre los procesos de inmunidad, las células integrantes del sistema inmunitario secretan *citoquinas* que influyen sobre las funciones neuroendocrinas. Por esta razón, en los sistemas biológicos de comunicación e integración es posible reunir en la misma categoría de mediadores químicos a hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores y citoquinas.

RECEPTORES

La especificidad de las hormonas, neurotransmisores y otros mensajeros químicos y su capacidad para identificar el blanco son posibles gracias a la presencia de *receptores* en las células efectoras.

(Si bien los conceptos que se exponen a continuación hacen referencia a hormonas, básicamente son válidos para todos los intermediarios químicos).

Estos receptores son proteínas a las cuales la hormona se fija selectivamente en virtud de una estrecha adaptación conformacional o complementariedad estructural. La hormona (H) y su receptor (R) forman un complejo (HR) que presenta las siguientes características destacables:

a) *Adaptación inducida*. A semejanza de la unión sustrato-enzima, la fijación de la hormona al receptor implica una adaptación estructural recíproca de ambas moléculas.

b) *Saturabilidad*. El número de receptores existentes en una célula es limitado; si se representa en un sistema de coordenadas la cantidad de hormona fijada a receptores en una porción determinada de tejido en función de la concentración de hormona, se obtiene una curva hiperbólica.

c) *Reversibilidad*. La unión hormona-receptor es reversible.

El concepto de receptor es aplicable a las macromoléculas que unen selectivamente hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, citoquinas y otras moléculas que inducen en ellos un cambio conformacional e inician las acciones determinantes del efecto final.

El carácter y naturaleza de la respuesta dependen de la especialización funcional de la célula "blanco". A veces una misma hormona desencadena respuestas diferentes en células distintas. Por ejemplo, la adrenalina produce activación de la glucogenólisis en músculo esquelético y estimula la lipólisis en adipocitos.

Se denominan *agonistas* los compuestos de estructura semejante a la del agente fisiológico (hormona, neurotransmisor) con capacidad para unirse al receptor y provocar respuesta. Esta puede ser de igual, mayor, o menor intensidad que la inducida por el agente natural. Los *antagonistas* se fijan al receptor, pero no producen respuesta. Se comportan como *inhibidores competitivos*.

Localización de los receptores. Los receptores de hormonas pueden estar ubicados en el interior de la célula o en la membrana externa.

Hormonas de carácter poco polar, como las esteroides, tiroideas, metabolitos de vitamina D y retinoides, atraviesan con facilidad las membranas y se unen a receptores intracelulares. Las de naturaleza proteica o peptídica y las de molécula pequeña pero francamente polar no pueden franquear la bicapa lipídica; se fijan a receptores en la superficie de la célula blanco. Los eicosanoides, a pesar de su solubilidad en lípidos, se unen a receptores de superficies celulares.

La membrana no es un dispositivo rígido sino dotado de un alto grado de fluidez, gracias a la cual las proteínas asociadas a la membrana tienen libertad para desplazarse en todas direcciones en el plano formado por la doble capa; por ello se habla de *receptores móviles*.

Algunas hormonas fijadas a receptores de membrana plasmática son internalizadas en la célula por endocitosis (pág. 220).

Número de receptores. La utilización de hormonas marcadas con isótopos radiactivos permite detectar la formación de complejos HR y estimar su cantidad. El número de receptores de un tipo determinado en la superficie de una célula puede alcanzar muchos miles. La cantidad de receptores intracelulares es generalmente mucho menor. No es necesario que la totalidad de los receptores de la célula esté unida a hormona para obtener una respuesta máxima. Comúnmente esto ocurre cuando alrededor del 20% de los receptores está ocupado por hormona. El resto corresponde a los llamados *receptores de reserva*.

La cantidad de receptores para un determinado ligando varía en distintos estados fisiológicos. Generalmente la concentración de hormona regula la cantidad de receptores específicos en las células blanco. Un aumento sostenido del nivel de hormona provoca disminución del número de receptores disponibles. Este fenómeno de regulación "reductora" es denominado "*desensibilización*" o, en inglés, *down regulation*. El fenómeno contrario, aumento del número de receptores, regulación "incrementadora" o *up regulation*, se produce cuando hay deficiencia del ligando específico.

En algunos casos de receptores de membrana, la disminución de receptores o *down regulation* se realiza mediante un proceso de internalización de receptores por endocitosis. A la inversa, la *up regulation* puede deberse a inserción en la membrana de receptores contenidos en vesículas intracelulares.

La disminución absoluta o relativa de la actividad de receptores puede obedecer a alteraciones genéticas (mutaciones) que afectan al receptor o a algunos de los eslabones del sistema de transducción de señales más allá del receptor, o a procesos autoinmunes (pág. 690) en los cuales se producen anticuerpos contra un receptor determinado, o a otras causas.

Mecanismo de acción. Para ejercer su acción, el complejo HR debe interactuar con otras estructuras de la célula. En este sentido deben diferenciarse los receptores localizados en el interior de la célula de los que se encuentran en la membrana plasmática.

Receptores intracelulares

Median las acciones de hormonas esteroides, tiroideas, metabolitos activos de vitamina D (pág. 582) y retinoides (pág. 575). También pueden unirse a ellos ácidos grasos, ácidos biliares, xenobióticos y otras moléculas poco polares que pueden ingresar a las células por difusión a través de las membranas (también podrían introducirse por transporte facilitado). Las hormonas son retenidas en las células que poseen en su interior receptores específicos. Algunos de estos receptores se localizan en el citoplasma y otros están confinados en el núcleo. Tanto los citoplasmáticos como los nucleares tienen una estructura molecular semejante y, cuando son estimulados por la unión del ligando específico, ejercen acción directa sobre el ADN nuclear regulando la actividad de transcripción.

Los receptores intracelulares se agrupan en dos familias: a) *receptores de esteroides* (se los encuentra frecuentemente en el citoplasma), comprenden los receptores de glucocorticoides (GR), de mineralocorticoides (MR), de progesterona (PR) y de andrógenos (AR) y b) *receptores tiroideos o nucleares*, incluyen los de estrógenos (ER), de hormonas tiroideas (TR), de metabolitos de vitamina D [1,25-$(OH)_2$-D_3] (VDR), de retinoides o ácido retinoico (RAR y RXR) y los receptores activados por proliferador de peroxisomas (PPAR) (págs. 577 y 488).

Receptores de esteroides. En general se encuentran en el citoplasma formando complejos

con proteínas de shock térmico (HSP 90, HSP 70 y HSP 56) del tipo de las chaperonas (pág. 475), que los mantienen inactivos.

Al llegar, la hormona se une a su receptor específico con gran afinidad y desplaza a la HSP. El receptor sufre un cambio conformacional, forma dímeros (homodímeros) que ingresan en el núcleo y se fijan a sitios definidos del ADN llamados *elementos de respuesta a la hormona* (HRE), generalmente ubicados "corriente arriba" del promotor del gen "blanco". Los elementos de respuesta son repeticiones invertidas de segmentos palindrómicos, separadas por dos a cinco pares de bases. Desde su lugar de fijación en el elemento de respuesta, el complejo hormona-receptor interacciona con factores de transcripción unidos al sitio promotor e influye sobre el complejo de iniciación encargado de ubicar correctamente a la polimerasa II y asegurar el comienzo de la transcripción (fig. 25-2).

Receptores tiroideos o nucleares. Se localizan en el núcleo, donde, al estado inactivo, no están libres sino unidos a elementos de respuesta en el ADN. En ausencia de hormona, sólo el receptor de estrógenos (ER) está fijado a HSP; los restantes se asocian a una molécula correpresora que inhibe la transcripción. El correpresor (o las HSP en los ER) es desplazado al formarse el complejo hormona-receptor, que se dimeriza y adquiere capacidad para influir sobre la transcripción. Sólo el ER se asocia como homodímeros, los TR, VDR, RAR, RXR y PPAR preferentemente forman heterodímeros. Comúnmente, los TR, VDR, RAR y PPAR se unen a RXR para formar heterodímeros.

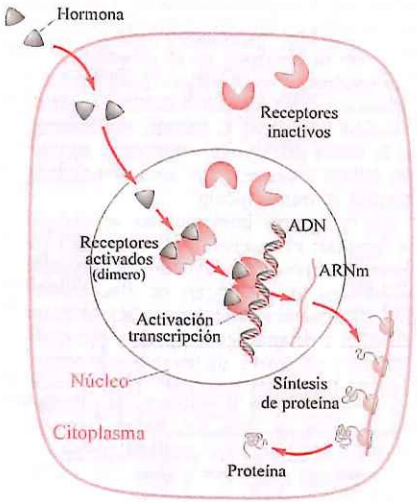


Fig. 25-2. Mecanismo de acción de hormonas esteroides.

Estructura. Los receptores intracelulares pertenecen a una superfamilia de moléculas estructuralmente homólogas, derivadas de un gen ancestral común. Presentan tres dominios funcionales (fig. 25-3): a) El primero, a partir del extremo N-terminal, exhibe gran variabilidad entre los miembros de la familia, tanto en extensión como en secuencia; es el sector hipervariable (HV). Una porción de este dominio participa en acciones reguladoras de la transcripción. En los receptores de glucocorticoides, mineralocoricoides, progesterona y andrógenos, la porción HV es más extensa que en los de estrógenos, hormonas tiroideas, 1,25-$(OH)_2$-D_3 y retinoides. b) A continuación se extiende el dominio central, en el cual se encuentran dos dedos de zinc (pág. 469) capaces de interactuar con secuencias específicas en el ADN. En este segmento se observan las mayores homologías entre los componentes de la superfamilia (60 a 95% de aminoácidos idénticos). El mismo motivo estructural se encuentra en muchas proteínas nucleares que actúan como factores de transcripción. c) El tercer dominio, correspondiente a la porción C terminal, posee el sitio de unión de la hormona. En la familia de receptores tiroideos, esta porción tiene gran homología con la proteína del protooncogén *c-erb A*.

Receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR). (*PPAR*, de *peroxisome proliferator activated receptor*). Existen varios de estos receptores nucleares cuyos ligandos son productos metabólicos endógenos; existen tres subtipos (α, β/δ y γ) que difieren en su distribución tisular; todos ellos son, en general, activados por ácidos grasos poliinsaturados y compuestos derivados. Se encuentran en hígado, músculo, tejido adiposo y otros. Los fármacos hipolipidémicos del tipo de fibratos son poderosos ligandos de PPARα.

Actúan como factores de transcripción, regulando la actividad génica. La fijación del ligando provoca su dimerización con receptores de retinoides (RXR), lo cual le permite asociarse a elementos de respuesta en zonas regulatorias del ADN en los genes "blanco". Además de estimular la transcripción, también pueden reprimirla

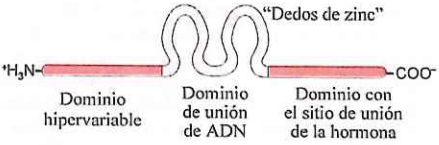


Fig. 25-3. Representación esquemática de un receptor de esteroides.

interfiriendo la acción de agentes como el factor nuclear κB, proteínas STAT y otros. La función de los PPAR puede describirse como la de reguladores o coordinadores de vías metabólicas.

Una de las principales acciones de PPARα es estimular la oxidación de ácidos grasos. La activación de PPARδ aumenta las oxidaciones en tejidos adiposo y muscular. PPARγ es necesario en tejido adiposo para la diferenciación de adipocitos. Su acción se ejerce a través del control de la expresión de genes vinculados no sólo a adipogénesis y metabolismo lipídico, sino también al mantenimiento de la homeostasis metabólica en general y a la inflamación.

La estimulación de PPAR mejora la tolerancia a la glucosa y disminuye la resistencia a la insulina en pacientes con diabetes tipo 2.

Es interesante el hallazgo de que fármacos antidiabéticos se unen con gran afinidad a PPARγ y mejoran la sensibilidad a la insulina.

Receptores de membrana plasmática

Los receptores en la superficie de las células integran sistemas de transmisión o transducción de señales. La llegada de una molécula de hormona, considerada el *primer mensajero* en el sistema, produce cambios conformacionales en su receptor específico, los cuales son transmitidos a proteínas efectoras (enzimas o canales). Como resultado de la activación de enzimas, en algunos casos se producen moléculas de pequeño tamaño (*segundos mensajeros*) que difunden rápidamente y hacen más efectiva la propagación de la señal en el interior de la célula.

Hormonas diferentes, que actúan en células distintas y suscitan respuestas muy disímiles, suelen utilizar los mismos intermediarios para cumplir su acción. Por esta razón, el repertorio de sistemas transductores de señales es más reducido que el de hormonas.

Se considerarán a continuación estructura y propiedades de los tipos principales de receptores de membrana.

Receptores asociados a proteínas G

Comprenden una numerosa familia de receptores de superficie que presentan siete hélices α transmembrana de 22 a 26 residuos hidrofóbicos cada una (fig. 25-4); la secuencia de estos dominios ha sido conservada sin mayores modificaciones en todos los miembros de la familia. El extremo N-terminal, al que se insertan cadenas oligosacarídicas, y las asas que unen los segmentos 2-3, 4-5 y 6-7, son extracelulares; la hormona se une al nicho formado por los extremos externos de las hélices α transmembrana. Las asas entre las hélices 3-4 y 5-6 y el extremo C-terminal se encuentran en el lado citosólico e interaccionan, cuando el receptor es activado por la hormona, con proteínas G ubicadas en la faz interna de la membrana plasmática. Se han descripto 5 o 6 clases, que difieren entre sí en secuencia de aminoácidos y en la longitud del segmento N-terminal extracelular. La mayoría pertenece a las clases A, B y C.

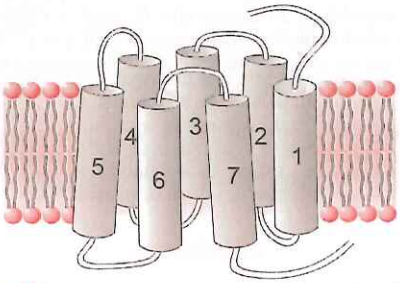


Fig. 25-4. Esquema de receptor asociado a proteínas G.

Pertenecen a esta familia de receptores los de hormonas paratiroidea, luteinizante, foliculoestimulante, tiroestimulante, ACTH, glucagón, vasopresina, angiotensina II, factor activador de plaquetas, sustancia P, prostaglandinas, adrenérgicos α y β, colinérgicos muscarínicos, serotoninérgicos, dopaminérgicos, de bastoncillos de retina (rodopsina).

El mecanismo general de acción, representado en la figura 25-5, es el siguiente: a) La unión de la hormona al receptor induce en éste un cambio conformacional que le permite inte-

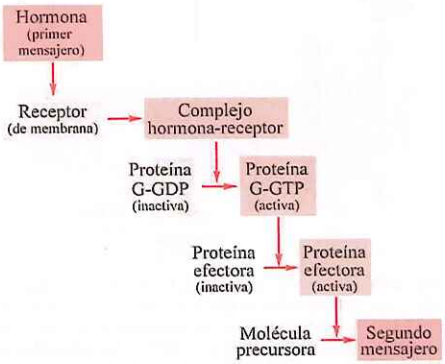


Fig. 25-5. Mecanismo general de acción de receptores asociados a proteínas G.

ractuar con una proteína G en la cara interna de la membrana. b) La proteína G, unida a GDP en su estado inactivo, reemplaza el GDP por GTP y se activa. c) La proteína G activada estimula una enzima localizada en la membrana, que cataliza la producción de *segundos mensajeros*. d) El segundo mensajero continúa la serie de reacciones "en cascada", provocando cambios en proteínas celulares responsables de la respuesta final.

Proteínas G

Las proteínas G, así llamadas por su propiedad de unirse a nucleótidos de guanina (GDP o GTP), juegan un papel esencial en sistemas de transducción de señales. Sirven de nexo entre receptores de siete pasos transmembrana y proteínas efectoras dentro de la célula.

Muchas hormonas circulantes o liberadas localmente, neurotransmisores y otros estímulos (luminosos, odoríferos o gustativos) activan a sus receptores específicos e inician una cadena de señales en la cual la proteína G representa el segundo eslabón.

Las proteínas G son heterotriméricas, constituidas por una subunidad α de masa molecular entre 40 y 45 kDa, una β de 37 kDa y una γ de 8 kDa. Las subunidades β y γ forman un conjunto estrechamente asociado que funciona como una unidad (dímero βγ). El heterotrímero está adosado a la cara interna o citosólica de la membrana, a la cual se mantiene "anclado". La subunidad α es fijada a la doble capa lipídica por un resto miristoílo cuyo carboxilo forma una unión amídica con el grupo amina de la glicina N-terminal de la proteína. Algunos tipos de subunidad α están anclados por un resto palmitoílo. La cadena hidrocarbonada del ácido graso se inserta en el interior hidrofóbico de la membrana. Por su parte, la subunidad γ está asociada a la doble capa por una cadena isoprenoide (farnesilo o geranil-geranilo) que se une por enlace tioéster a un resto cisteína próximo al extremo C-terminal del polipéptido y se introduce luego en el espesor de la membrana (fig. 25-6).

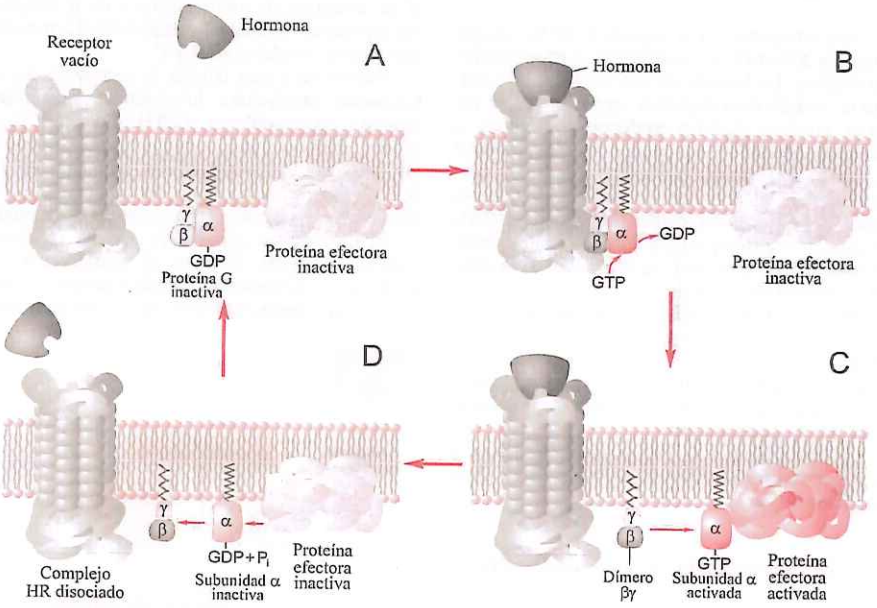


Fig. 25-6. Mecanismo general de acción de proteínas G. **A.** El receptor de membrana vacío y la proteína G (trímero αβγ) con su subunidad α fijada a GDP son inactivos. **B.** Al unirse el ligando a la porción extracelular del receptor produce una deformación que se transmite al dominio citosólico y le permite actuar sobre la proteína G. El GDP de la subunidad α es reemplazado por GTP. **C.** La subunidad α-GTP activada se separa del dímero βγ y puede interaccionar con una proteína efectora. **D.** El ligando se separa del receptor, el GTP es hidrolizado a GDP y P_i, se reconstituye el trímero αβγ inactivo y se cierra el ciclo.

La subunidad α posee el sitio que fija con alta afinidad nucleótidos de guanina (GDP o GTP). Mientras está unida a GDP se mantiene firmemente asociada al conjunto βγ para integrar el heterotrímero, que es inactivo. La llegada de hormona al receptor modifica la orientación de los segmentos transmembrana lo que les permite interaccionar con proteína G inactiva y determinar un cambio en su conformación. Este cambio causa la disociación del GDP unido a la subunidad α y promueve la unión de GTP, cuya concentración en la célula es mayor que la de GDP. El complejo α-GTP se separa del dímero βγ y adquiere actividad moduladora sobre la proteína efectora que le sigue en el sistema de señales (fig. 24-6).

La subunidad α tiene actividad GTPasa; es capaz de hidrolizar el GTP fijado para dar GDP y P_i libre. La subunidad α unida a GDP vuelve a fijarse al dímero βγ y reconstituye el heterotrímero inactivo.

Se ha reconocido la existencia de 20 tipos distintos de subunidades α, 5 de β y 12 de γ, lo cual explica la existencia de gran número de heterotrímeros diferentes de proteínas G. Estas han sido agrupadas en familias según el tipo de subunidad α que poseen. Las proteínas G_s tienen una subunidad α_s y se encuentran en casi todas las células. En la mayoría de casos, su acción se expresa por la activación de adenilato ciclasa; algunas proteínas de este tipo modulan canales de iones (Ca^{2+} y Na^+). A este grupo pertenecen también las proteínas G con subunidad α_{olf}, presentes en el epitelio olfatorio y vinculadas a la transmisión de estímulos odoríferos.

El grupo G_i posee subunidades α_i y está distribuido en casi todas las células. Tiene efecto inhibitorio sobre adenilato ciclasa y regula el funcionamiento de canales de iones (K^+ y Ca^{2+}). Al grupo de proteínas G_i pertenecen también las que contienen subunidades α_o, aisladas de cerebro, α_t (transducina) de conos y bastoncillos de la retina, α_g de papilas gustativas y α_z de cerebro, adrenales y plaquetas. Las subunidades α_s y α_i son sensibles a las toxinas colérica y *pertussis* respectivamente (ver más adelante).

Otros tipos de proteínas G, como las G_q y G_{12}, no son afectadas por las toxinas mencionadas. Las proteínas G_q contienen subunidades α_q y están ampliamente distribuidas en los tejidos. Su activación las capacita para poner en acción a la fosfolipasa C y con ella al sistema fosfatidilinositolbisfosfato, que se considerará más adelante. En algunos tejidos se han encontrado otras subunidades α pertenecientes a este grupo (designadas con números, α_{11} a α_{16}).

Evidencias experimentales indican que el dímero βγ, al cual inicialmente no se le reconoció un papel significativo, cumple también funciones de intermediario en el sistema de señales. Actúa sobre diferentes proteínas "blanco", entre ellas canales de K^+ y Ca^{2+}, adenilato ciclasa, fosfolipasa C y diversas proteína quinasas.

Se han descripto mutaciones responsables de cuadros patológicos, tanto en genes que controlan la síntesis de receptores acoplados a proteínas G como en los que codifican la subunidad α.

Receptores proteína-tirosina quinasa

Los receptores acoplados a proteínas G requieren la mediación de éstas para modificar la actividad de enzimas integrantes del sistema de señales. En cambio, existen receptores con actividad catalítica en su propia molécula y otros asociados directamente a enzimas.

Receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca. Median las acciones de insulina, y de factores de crecimiento. En su mayoría están constituidos por una cadena polipeptídica cuyo extremo N-terminal, extracelular, posee el sitio de unión del ligando. Es común la presencia de numerosos restos cisteína en este dominio. Al dominio extracelular le siguen una hélice α transmembrana y la porción citosólica, correspondiente al segmento C-terminal, donde se encuentra el sitio con actividad de tirosina quinasa (fig. 25-7 A).

El receptor de insulina es de esta clase, pero algo más complejo; está formado por dos heterodímeros αβ unidos entre sí por puentes disulfuro. Las subunidades α, extracelulares, poseen el lugar de unión de la hormona. Cada una de las subunidades β tiene un segmento transmembrana y un dominio citosólico con actividad tirosina quinasa (fig. 25-7 B).

La fijación del ligando a la subunidad extracelular de estos receptores induce la dimerización del receptor (excepto en el de insulina, originalmente formado por dos heterodímeros) y activación de la tirosina quinasa. Se produce fosforilación cruzada de una cadena a otra en varios restos tirosina del dominio citosólico; se habla de *autofosforilación* del receptor. Como resultado de estas fosforilaciones aumenta aún más la actividad de la quinasa y se crean sitios a los cuales pueden unirse otras proteínas que actúan como eslabones en la cadena de transducción de la señal.

Los restos fosfotirosina promueven la fijación a la porción citosólica del receptor, de proteínas que contienen dominios SH2 y SH3 (SH de Src homología), así llamados porque tienen similitud con la proteína oncogénica Src del virus del sarcoma de Rous (pág. 462). Los dominios SH consisten de

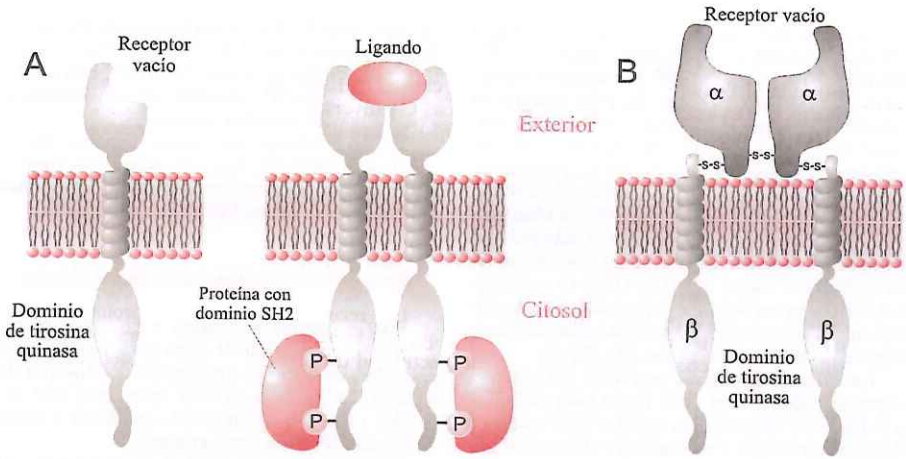


Fig. 25-7. Esquema de receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca. **A.** A la izquierda se representa un receptor de factor de crecimiento epidermal. A la derecha, el mismo receptor activado. La unión del ligando en la porción extracelular dimeriza el receptor y activa a la tirosina quinasa, que fosforila restos tirosina. La presencia de grupos tirosinilfosfato promueve la unión de proteínas con dominios SH2, que también se fosforilan y permiten continuar la transmisión de señales en el sistema. **B.** Receptor de insulina formado por dos heterodímeros αβ unidos por puentes disulfuro.

secuencias conservadas, de aproximadamente 100 residuos aminoacídicos, presentes en muchas proteínas que integran sistemas de transducción. Tienen la propiedad de fijarse a restos tirosina-fosfato de otras proteínas. La proteína con dominio SH unida al receptor activado es fosforilada en restos tirosina y a su vez promueven la asociación de otras proteínas con dominios SH.

Receptores asociados a serina-treonina quinasas. Tienen estructura similar a los tirosina quinasa; difieren en su especificidad. En vez de restos tirosina, fosforilan residuos serina o treonina. Median las acciones biológicas de gran número de ligandos que pertenecen a la familia del factor de transformación (TGF). Se han descripto 42 genes que codifican citoquinas de la familia TGFβ, entre ellas las de la familia de la *activina* que, con las de la familia de la *inhibina*, son de interés en la modulación de hormonas relacionadas con la reproducción.

Los receptores serina-treonina quinasa activados estimulan a otras proteínas, como las *Smad*, moléculas efectoras que les siguen en la cadena de señales. También fosforilan a muchos de los receptores tirosina quinasa, incluyendo el de insulina, y los inhiben.

Receptores asociados a tirosina quinasa extrínseca. Existe otra familia de receptores sin actividad tirosina quinasa propia, pero con capacidad para asociarse a proteína-tirosina quinasas del citoplasma. Este grupo incluye los receptores de *citoquinas* (pág. 687) y de algunas hormonas proteicas (ej.: hormona de crecimiento, prolactina, leptina). Son semejantes en estructura a los receptores proteína-tirosina quinasa descriptos, aunque no presentan sitio catalítico (fig. 25-8). Cuando el ligando se fija al dominio extracelular

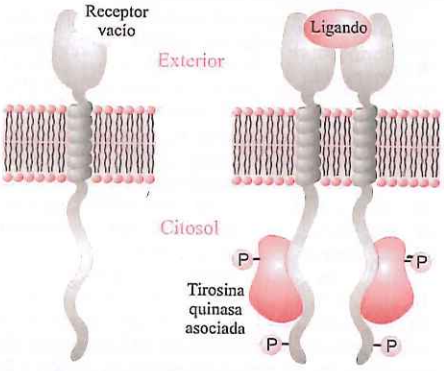


Fig. 25-8. Esquema de receptor asociado a tirosina quinasa extrínseca. A la izquierda, el receptor inactivo. A la derecha, la unión del ligando (hormona de crecimiento, citoquina) dimeriza el receptor y modifica el dominio citosólico de manera que puede interactuar y activar una tirosina quinasa, la cual fosforila restos tirosina en la propia enzima y en el receptor.

se produce dimerización y la porción citosólica interacciona con tirosina quinasa. El receptor es fosforilado por la quinasa en varios restos tirosina que facilitan la unión de proteínas con dominios SH2. El resultado es prácticamente el mismo que el descripto para receptores con tirosina quinasa incluida en su molécula.

Estos receptores se distinguen en dos familias principales: algunos son miembros de la familia Src (SH2), homólogos de la proteína oncogénica del virus del sarcoma de Rous y otros pertenecen a la familia JAK, asociada a *tirosina quinasa Janus*. Los primeros participan en la señalización desde receptores de citoquinas y desde antígenos en linfocitos B y T (ver pág. 685); las quinasas JAK acoplan los receptores a la fosforilación de diversas moléculas blanco dentro de la célula.

Receptores tirosina fosfatasas. Se han descripto receptores asociados a proteína-tirosina fosfatasas, como el CD45 de linfocitos B y T. Separan los fosfatos insertados por las quinasas y antagonizan la acción de éstas. El genoma humano codifica un gran número de tirosina fosfatasas, cuyas funciones fisiológicas son motivo de estudio.

Receptores asociados a guanilato ciclasa. Algunas hormonas y otros agentes de naturaleza peptídica se unen a receptores de membrana cuyo dominio citosólico tiene actividad guanilato ciclasa, enzima que cataliza la formación de GMP cíclico a partir de GTP. Estos receptores guanilato ciclasa están constituidos por una cadena polipeptídica con un dominio extracelular al cual se une el ligando, una hélice α transmembrana y un dominio citosólico con varios dominios, de los cuales el terminal posee actividad enzimática. La fijación del ligando estimula la ciclasa y genera en el citosol GMP cíclico, que actúa como segundo mensajero. A esta clase de receptores pertenecen los de péptidos natriuréticos atriales.

Se mencionará aquí, aunque no son receptores de membrana sino intracelulares, a otro tipo de receptores guanilato ciclasa. Son hemoproteínas citosólicas activadas por pequeñas moléculas que atraviesan fácilmente membranas, los mensajeros paracrinos óxido nítrico (NO) y monóxido de carbono (CO).

También está relacionado con GMPc el receptor de bastoncillos de la retina (rodopsina), cuya activación por el estímulo luminoso es transmitida a través de proteína G. Reduce la concentración de GMP-3,5-cíclico por activación de la fosfodiesterasa específica.

Desensibilización. La exposición continuada a un agonista produce disminución de la capacidad de respuesta de los receptores. A este fenómeno se lo llama *desensibilización* y ha sido extensamente estudiado en receptores acoplados a proteínas G. La desensibilización puede ser provocada por fosforilación, por internación en la célula o por disminución de la síntesis del receptor.

La fosforilación de residuos serina o treonina por quinasas específicas es el medio más rápido de producir desacoplamiento del receptor de la proteína G.

Un caso bien estudiado es el del fotorreceptor de retina (rodopsina), donde la fosforilación por sí sola no es suficiente para inactivarlo completamente; se requiere, además, la participación de una proteína llamada *arrestina*. Se ha comprobado la existencia de arrestinas en otros tejidos, especialmente el nervioso.

Otro de los mecanismos de desensibilización, la internación del receptor en la célula, se produce por endocitosis.

SISTEMAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Sistema del AMP-3',5'-cíclico

El descubrimiento de adenosina-3',5'-monofosfato (AMP cíclico) a fines de la década del 50 (siglo XX) abrió un nuevo campo que permitió establecer mecanismos básicos generales para explicar la acción de numerosas hormonas.

El AMP-3',5'-cíclico (AMPc) (fig. 25-9) recibe este nombre porque el fosfato forma un ciclo entre los hidroxilos de los carbonos 3' y 5' de la ribosa. El AMP cíclico es una sustancia ubicua; se encuentra en todos los organismos vivientes y en casi todas las células de mamíferos. En algunas de esas células la exposición a determinadas

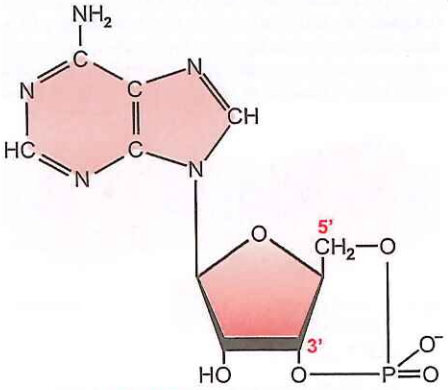


Fig. 25-9. AMP-3',5'-cíclico.

hormonas produce un rápido aumento de la concentración de AMPc en su interior.

El AMPc se genera a partir de ATP en reacción catalizada por *adenilato ciclasa*, enzima que requiere Mg^{2+} y se localiza en la membrana plasmática.

$$ATP \xrightarrow[Mg^{2+}]{\text{Adenilato ciclasa}} \text{AMP-3',5'-cíclico} + PP_i$$

Adenilato ciclasa. Es una proteína integral de membrana plasmática de más de 100 kDa. Está formada por una cadena polipeptídica compuesta por dos porciones iguales, unidas en tándem, cada una de las cuales posee los siguientes dominios: un segmento N-terminal intracelular seguido de seis hélices transmembrana y un largo dominio citosólico (fig. 25-10). Los segmentos citosólicos situados a continuación de cada conjunto de seis hélices transmembrana contienen el sitio catalítico. La estructura descripta semeja más la de algunos transportadores o canales que la de una enzima de membrana. Sin embargo, no se ha detectado actividad de canal en la adenilato ciclasa, ni existen homologías de secuencia con transportadores. En mamíferos se han identificado nueve formas diferentes de adenilato ciclasa, expresadas en variadas proporciones en distintos tejidos y con propiedades regulatorias diferentes. Prácticamente todas son activadas por la subunidad α_s de proteína G; no todas son inhibidas por α_i; el Ca^{2+}, Ca^{2+}-calmodulina y proteína quinasa C ejercen efectos sobre algunas de ellas.

El sistema, esquematizado en la figura 25-11, funciona del modo siguiente:

1. El cambio conformacional producido en el receptor por la unión del ligando constituye la primera señal, que se transmite a moléculas de proteínas G. Existen receptores y proteínas G estimuladores (R_s y G_s) e inhibidores (R_i y G_i). Cuando el receptor ocupado por la hormona es de tipo estimulador (R_s), interactúa con proteínas G_s. En cambio, los receptores acoplados a proteínas G_i transmiten una señal inhibitoria. Mientras el receptor está vacío, el heterotrímero de la proteína G se mantiene inactivo, con su subunidad α ligada a GDP.

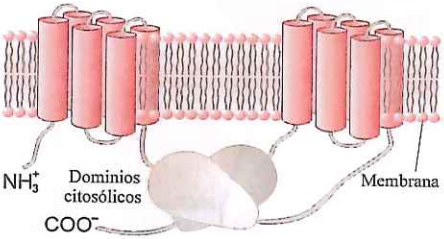


Fig. 25-10. Estructura de la adenilato ciclasa.

2. La interacción con el complejo HR produce modificaciones en la proteína G, en la cual la subunidad α se desprende del GDP y fija GTP procedente del citosol. La unión de GTP disocia la subunidad α del dímero $\beta\gamma$. El complejo α_s-GTP tiene capacidad para activar la adenilato ciclasa. En el caso de receptores acoplados a proteínas G_i, se desprende α_i-GTP, de acción inhibitoria sobre la enzima. El dímero $\beta\gamma$ también puede cumplir, *per se*, acciones de transmisor de señales.

3. La adenilato ciclasa activada cataliza la formación de AMPc a partir de ATP y eleva la concentración de ese segundo mensajero en la célula.

4. La subunidad α posee actividad GTPasa, cataliza la hidrólisis de GTP y queda unida a GDP, por lo cual vuelve a asociarse con el dímero $\beta\gamma$ para reconstituir la proteína G inactiva y deja de actuar sobre adenilato ciclasa.

La toxina producida por *Vibrio cholerae* es responsable del cuadro clínico del cólera, caracterizado por profusas diarreas, deshidratación y desequilibrio iónico. Estos síntomas son causados por el aumento del nivel de AMPc en las células de la mucosa intestinal. La toxina promueve la *ADP-ribosilación* (pág. 478) de la subunidad α_s de proteína G_s. En la reacción se utiliza NAD como cofactor y se transfiere ADP-ribosa del NAD a un residuo arginina. Esta modificación covalente bloquea la actividad GTPasa de la subunidad α. En consecuencia, no se desactiva la adenilato ciclasa y, por ende, se sostiene la producción de AMPc.

El mecanismo de ADP-ribosilación es común en la acción de distintas toxinas bacterianas. La toxina producida por *Bordetella pertussis*, agente de la tos ferina o convulsa, actúa por ADP-ribosilación de la subunidad α_i. Esta modificación la mantiene unida a GDP y al dímero $\beta\gamma$ e impide su acción inhibitoria sobre adenilato ciclasa. El resultado es el aumento de los niveles de AMPc en la célula atacada.

Modo de acción del AMP cíclico. El AMPc difunde en la célula y estimula la *proteína quinasa A*. El mecanismo de activacion de la proteína quinasa es el siguiente: la proteína quinasa A (dependiente de AMPc) en ausencia de AMPc se encuentra inactiva, formando un tetrámero constituido por dos subunidades llamadas *catalíticas* (C) y dos monómeros *reguladores* (R). Cuando aumenta el nivel de AMP cíclico en la célula, dos moléculas del nucleótido se fijan a sitios de unión específicos en cada una de las subunidades reguladoras (fig. 25-12, R); se produce un cambio conformacional que las obliga a desprenderse

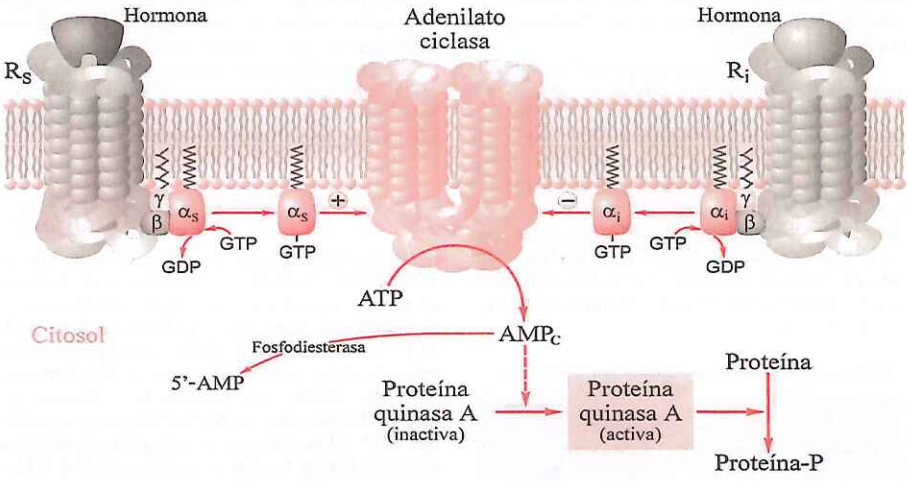


Fig. 25-11. Esquema del sistema de AMP-3'.5'-cíclico.

tores de células sensibles a estímulos odoríferos en la mucosa nasal están acoplados a proteínas G_{olf}. La subunidad α_{olf} activa adenilato ciclasa. El

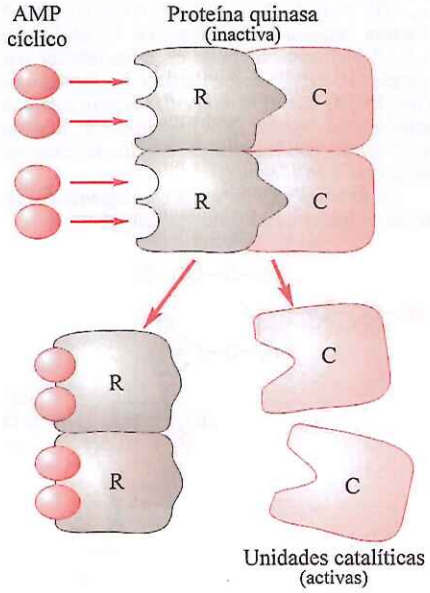


Fig. 25-12. Activación de la proteína quinasa por AMP cíclico.

de las catalíticas (C). Las subunidades C libres tienen actividad enzimática. El proceso puede representarse por la ecuación:

$$R_2C_2 + 4\,AMP_c \longrightarrow R_2\text{-}AMP_{c_4} + 2\,C$$

Tetrámero inactivo — Complejo unidades reguladoras AMP cíclico — Unidades catalíticas libres (activas)

La unidad catalítica de proteína quinasa A transfiere fosfato de ATP a restos serina o treonina de proteínas que, al ser fosforiladas, adquieren nuevas propiedades.

El AMPc es un mensajero plurivalente que provoca respuestas muy distintas en diferentes células (tabla 25-1). Aunque la respuesta varía según el tejido considerado, en todos los casos la acción del AMPc se realiza a través de reacciones "en cascada" iniciadas con la activación de la proteína quinasa A, que cataliza la adición de fosfato a diversas proteínas.

Pueden distinguirse diferentes mecanismos de acción del AMPc: 1) La fosforilación de enzimas (modificación covalente) promovida por la proteína quinasa dependiente de AMPc produce, según los casos, estimulación o inhibición y constituye un importante mecanismo regulador del funcionamiento de vías metabólicas (ver pág. 381).

2) Modulación de la actividad de sistemas de transporte de membrana. Además de las acciones mediadas por proteína quinasa A, el AMPc promueve otras sobre canales de iones, no dependientes de fosforilación. Por ejemplo, los recep-

aumento del nivel de AMPc provoca apertura de canales de Na^+, despolariza la membrana y genera impulsos nerviosos.

3) A nivel del núcleo puede influir sobre la transcripción; en efecto, existen secuencias específicas en el ADN, llamadas elementos de respuesta dependientes de AMPc o *CRE* (del inglés *cAMP response element*). El aumento del nivel de AMPc en la célula estimula a la proteína quinasa A y ésta fosforila una proteína designada *CREB* (de *cAMP response element binding*), que entonces se une a secuencias CRE y activa la transcripción de genes; por ejemplo, los de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, tirosina aminotransferasa y varios citocromos P_{450}.

Tabla 25-1. Respuestas mediadas por AMP cíclico.

Hormona	*Tejido*	*Respuesta principal*
Adrenalina	Músculo Adiposo Corazón	Glucogenólisis Lipólisis Aumento del ritmo y fuerza en contracciones
Glucagón	Hígado Adiposo Corazón	Glucogenólisis Lipólisis Glucogenólisis
Adreno-corticotrófica (ACTH)	Corteza adrenal Adiposo	Esteroidogénesis Lipólisis
Luteinizante (LH)	Ovario Testículo Adiposo	Esteroidogénesis Esteroidogénesis Lipólisis
Tiroestimulante (TSH)	Tiroides Adiposo	Secreción de hormonas tiroideas Lipólisis
Paratiroidea	Hueso Riñón	Reabsorción de Ca^{2+} Excreción de fosfato
Vasopresina	Riñón	Reabsorción de agua
Prostaglandinas	Fibroblastos Plaquetas	Inhibición del crecimiento Inhibición de la agregación

Fosfodiesterasa. El AMP cíclico es un regulador muy potente y las células deben controlar su concentración. En la mayoría de los tejidos un importante factor de control es la *fosfodiesterasa*, enzima que cataliza la hidrólisis de la unión del fosfato al carbono 3' en el AMPc y lo convierte en adenosina-5'-monofosfato, inactivo. Metilxantinas como cafeína, teofilina y aminofilina inhiben la fosfodiesterasa, impiden la degradación del AMPc y mantienen su acción. Catecolaminas que se unen a receptores adrenérgicos α_1 y la insulina activan la fosfodiesterasa y producen reducción del nivel celular de AMPc.

Las fosforilaciones promovidas por proteína quinasa normalmente son revertidas por *proteína fosfatasas*, algunas asociadas a receptores transmembrana, otras libres en el citosol.

Sistema del fosfatidilinositolbisfosfato

El fosfatidilinositol (PI) es un componente de membranas celulares. Si bien cuantitativamente es menos importante que otros fosfolípidos de la membrana, tiene gran significación funcional. El PI forma parte de la doble capa lipídica de la membrana plasmática, ubicado preferentemente en la hoja interna (en contacto con el citoplasma). El fosfatidilinositol es fosforilado en los carbonos 4 y 5 del inositol por transferencia de fosfatos desde ATP, para formar fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) (fig. 25-13). Esta sustancia integra un sistema de transducción de señales.

La unión del ligando específico a un receptor de siete pasos transmembrana produce un cambio conformacional de la porción citosólica del receptor que lo capacita para interactuar con una proteína G_q. La subunidad α_q reemplaza su GDP por GTP y se libera del dímero $\beta\gamma$. El complejo α_q-GTP estimula la *fosfolipasa C* (forma β). Esta enzima cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato incluido en la membrana para generar *diacilglicerol* e *inositol-1,4,5-trisfosfato* (fig. 25-14). Las dos moléculas actúan como segundos mensajeros. Otra fosfolipasa C, la forma γ, se asocia con receptores proteína-tirosina quinasa (ver más adelante).

La figura 25-15 presenta un esquema del sistema de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato.

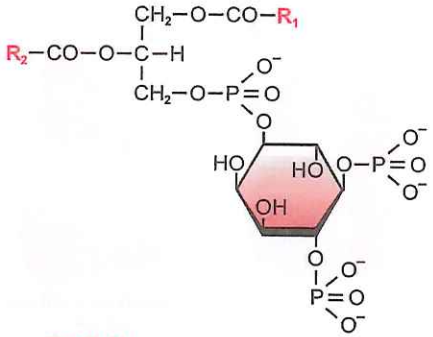


Fig. 25-13. Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato.

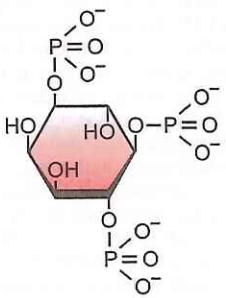


Fig. 25-14. Inositol-1,4,5-trisfosfato.

El inositol-1,4,5-trisfosfato (IP_3) liberado en el citosol se fija a receptores en la membrana del retículo endoplásmico (RE). Estos receptores son proteínas tetraméricas con múltiples dominios transmembrana que forman canales de Ca^{2+}. La unión de IP_3 produce apertura del canal y liberación de Ca^{2+} almacenado en las cisternas del RE, lo cual determina un aumento brusco del nivel de Ca^{2+} en el citosol, factor determinante de diversas respuestas celulares.

La acción del inositol-1,4,5,-trisfosfato es detenida por fosfatasas. El IP_3 es rápidamente desfosforilado sucesivamente a IP_2, IP e inositol por fosfomonoesterasas específicas. La hidrólisis de IP a inositol es inhibida por iones litio.

Inositol-3,4,5-trisfosfato. Se forma a partir de inositol-4,5-bisfosfato (PI-4,5-P2) por acción de la *fosfatoinositol-3-quinasa* (PI3K).

La PI3K es activada en respuesta a la estimulación de receptores de superficie por distintas hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento. El PI-3,4,5-P3 (PI3) induce activación de proteína quinasa B (PKB, también llamada Akt) componente importante de sistemas de señales dependientes de insulina y factores de crecimiento; se une a proteínas que contienen dominios llamados PH (de *pleckstrin homology*), entre ellas Akt/PKB y las activa.

Compuestos altamente fosforilados de inositol, como los difosfoinositolpentaquisfosfato e inositolhexaquisfosfato (ambos IP7), tienen efecto inhibitorio de la estimulación de Akt/PKB por PI3.

El diacilglicerol que queda en la membrana después de la hidrólisis del fosfatidilinositolbisfosfato funciona también como segundo mensajero. Su acción se ejerce a través de la activación de *proteína quinasa C*, localizada en la membrana (fig. 25-15). Esta enzima fosforila proteínas vinculadas a procesos de multiplicación celular y factores de transcripción. La tabla 25-2 presenta respuestas mediadas por este sistema. Algunos miembros de la familia de proteína quinasa C requieren Ca^{2+} y diacilglicerol para su activación.

La estimulación de la proteína quinasa C por diacilglicerol es interrumpida por hidrólisis de

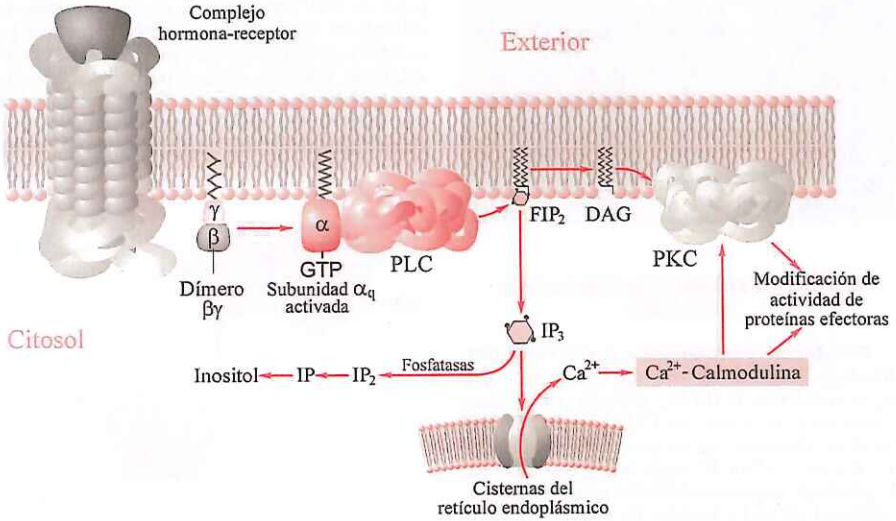


Fig. 25-15. Sistema del fosfatidilinositolbisfosfato. PLC, fosfolipasa C; DAG, diacilglcerol; PKC, proteína quinasa C.

este compuesto. En la reacción generalmente se libera araquidonato, precursor de eicosanoides.

El estudio de la acción tumorígena de *ésteres de forbol* ha mostrado la importancia de la proteína quinasa C en el control de la multiplicación celular. El forbol es un alcohol policíclico que forma ésteres con ácidos grasos, cuya estructura semeja la del diacilglicerol. Estos compuestos estimulan la proteína quinasa C. A diferencia de la activación producida por diacilglicerol, ésta es sostenida, ya que los ésteres de forbol no se degradan. La estimulación persistente de la proteína quinasa C promueve el desarrollo de tumores.

Además del diacilglicerol generado por hidrólisis de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato, otros derivados lipídicos pueden actuar como segundos mensajeros.

Tabla 25-2. Respuestas mediadas por el sistema del fosfatidilinositol bisfosfato.

Primer mensajero	*Tejido*	*Respuesta principal*
Hormona liberadora de tirotropina (TRH)	Adenohipófisis	Secreción de prolactina
Vasopresina	Hígado	Glucogenólisis
Factores de crecimiento	Fibroblastos	Síntesis de ADN
Acetilcolina	Páncreas (exócrino) Parótida Páncreas (cél. β) Músculo liso (vascular, gástrico)	Secreción de enzimas digestivas (amilasa,tripsinógeno) Secreción de insulina Contracción
Trombina	Plaquetas	Agregación
Antígeno	Células cebadas	Secreción de histamina

Lípidos en sistemas de transmisión de señales

Diacilglicerol producido a partir de fosfatidilcolina. Se ha identificado otro tipo de fosfolipasa, la *fosfolipasa D* (PLD), activada por diversos estímulos en la célula. La PLD hidroliza fosfatidilcolina, abundante en las membranas, y da ácido fosfatídico y colina. El ácido fosfatídico es atacado por *ácido fosfatídico hidrolasa* para liberar diacilglicerol (DAG) y fosfato. Es ésta una segunda vía que genera DAG como mensajero. Si bien este intermediario es el producto de la acción tanto de PLC como de PLD, las respuestas celulares en uno y otro caso suelen no ser idénticas. Probablemente esto se explique por diferencias de localización celular de las enzimas o de composición en ácidos grasos de los DAG generados.

Ceramida. Acciones iniciadas por algunos ligandos, especialmente citoquinas y 1,25-$(OH)_2$-D_3, producen activación de *esfingomielinasa*, enzima que actúa sobre esfingomielina y libera *ceramida* y fosfocolina. La ceramida es otro mensajero intracelular de naturaleza lipídica. Se han asignado varias funciones a la ceramida. Una de las más importantes es su participación en el proceso de muerte celular programada o apoptosis (pág. 703).

Esfingosina-1-fosfato (S1P) se une con gran afinidad a receptores acoplados a proteína G, generando múltiples señales; juega un papel importante en el desarrollo vascular e integridad del endotelio y en control del ritmo cardíaco.

GMP-3',5'-cíclico

La observación de variaciones en el nivel intracelular de guanosina-3',5'-monofosfato (GMP cíclico) provocadas por distintos factores, llevó a proponer la existencia de otro segundo mensajero; incluso se señaló que promovía acciones en sentido opuesto a las desencadenadas por AMP cíclico. El GMP-3',5'-cíclico (fig. 25-16), es generado a partir de GTP por acción de *guanilato ciclasa* localizada en la membrana. También se produce por acción de guanilato ciclasas localizadas en el citosol. Estas guanilato ciclasas pueden ser activadas por factores que atraviesan fácilmente membranas, como óxido nítrico y monóxido de carbono. En su momento, la comprobación de que estos ga-

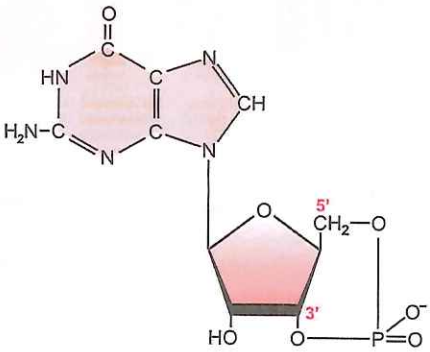


Fig. 25-16. GMP-3',5'-cíclico.

ses tóxicos actúan como mediadores de sistemas de señales fue realmente sorprendente.

El GMPc participa en diversos procesos: 1) activación de proteína quinasas relacionadas con la modulación del crecimiento y proliferación celular, 2) relajación del músculo liso (puede producir vasodilatación), 3) estimulación de la diuresis y natriuresis (la unión de péptido natriurético atrial a su receptor en la membrana plasmática activa a la guanilato ciclasa y eleva el nivel de GMPc en las células), 3) captación de estímulos luminosos y olfatorios. Participa como segundo mensajero que regula la apertura y cierre de canales de Na^+. En el caso de la retina, la rodopsina, fotorreceptor de los bastoncillos, tiene la estructura básica de siete hélices α transmembrana de acople a una proteína G llamada *transducina* (con subunidades α_t). La subunidad α_t activada estimula la *GMPc fosfodiesterasa* y disminuye el nivel de GMPc. Esto produce cierre de canales de Na^+, hiperpolariza la membrana y genera el impulso nervioso responsable de la sensación lumínica.

El aumento de GMPc en células de la mucosa intestinal es causa de diarrea.

Sistema Ras y quinasas MAP

Esta vía de transmisión de señales pone en acción una cascada de proteína quinasas muy importante en la regulación de numerosas funciones celulares. Todos sus componentes son proteínas, no se generan segundos mensajeros de molécula pequeña.

Cuando un receptor proteína-tirosina quinasa o asociado a proteína-tirosina quinasa es activado por su ligando, se fosforilan restos tirosina en el dominio citoplasmático y se crean sitios de unión para proteínas con dominios SH2 y SH3, como las *Grb* (de *growth factor receptor binding protein*) por ejemplo. Grb actúa como proteína adaptadora que facilita la unión de otras proteínas del sistema de señales, por ejemplo *Sos*, así llamada por su similitud con la aislada en *Drosophila* (*son of sevenless*). El complejo Grb-Sos fijado al receptor en un lugar próximo a la cara interna de la membrana plasmática interactúa con proteínas *Ras* (así designadas por su homología con proteínas del sarcoma de rata). Ras se encuentra al estado inactivo y es estimulada al asociarse con Grb-Sos (fig. 25-17).

Proteínas Ras. Son moléculas monoméricas, de alrededor de 21 kDa, que fijan nucleótidos de guanina (GDP o GTP) y tienen actividad GTPasa. Están ancladas en la faz citosólica de la membrana plasmática por una cadena isoprenoide farnesilo unida a un resto cisteína próximo al terminal C. Ras fijada a GDP es inactiva; su interacción con Grb-Sos promueve el cambio de GDP por GTP y determina su estimulación. La misma molécula Ras tiene capacidad para autorregularse, ya que cataliza la hidrólisis de GTP en GDP y P_i y completa el ciclo de activación-inactivación. Nótese la similitud entre Ras y la subunidad α de proteínas G.

La estimulación de Ras inicia una cascada de fosforilaciones en restos serina-treonina de proteínas. Las enzimas activadas sucesivamente son llamadas genéricamente quinasas MAP (de *mitogen activated proteins*). La primera fosforila y activa a una segunda y ésta a una tercera responsable de la fosforilación de la proteína efectora, que adquiere así capacidad para influir sobre la proliferación y diferenciación celular (fig. 25-17). En realidad, existen diversas vías iniciadas por Ras; las quinasas participantes en cada una de ellas son identificadas con distintas siglas. Una de esas

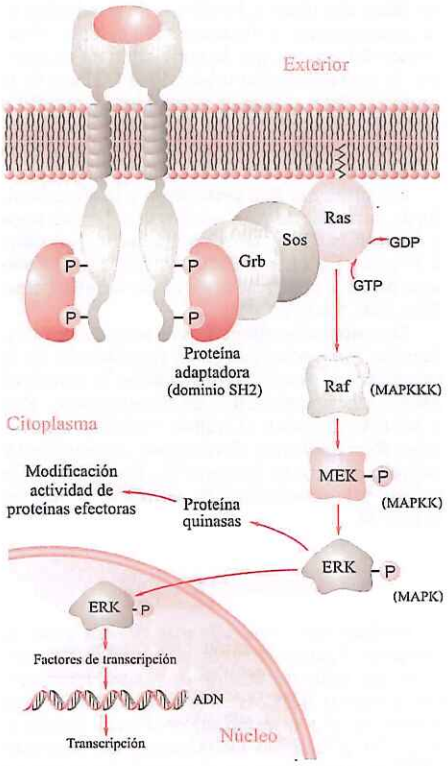


Fig. 25-17. Sistema de proteína Ras y cascada de MAP quinasas.

vías comienza con la activación por Ras-GTP de la proteína *Raf* (una quinasa MAP), la cual a su vez fosforila y estimula una segunda quinasa MAP llamada *MEK* (de *MAP-ERK kinase*). MEK es una quinasa dual, transfiere fosfato a restos serina-treonina y también tirosina; activa a miembros de la *familia de quinasas* MAP *reguladas por señales extracelulares* denominadas *ERK* (de *extracellular regulated kinase*). Estas quinasas fosforilan una variedad de proteínas "blanco" que incluyen otras proteína quinasas y factores de transcripción en el núcleo. Entre los genes cuya actividad es inducida por estas vías se cuentan los llamados inmediatos-tempranos, la mayoría de los cuales codifica factores de transcripción que influyen sobre otros genes y modifican su expresión.

El interés por las proteínas Ras se incrementó notablemente al comprobarse que alrededor del 30% de los cánceres humanos están asociados a mutaciones en el gen *ras*. Normalmente el gen *ras* es un protooncogén que codifica una proteína (Ras) vinculada a funciones de regulación de la multiplicación y diferenciación celular. Mutaciones del gen *ras* que lo convierten en oncogén por lo general afectan la actividad GTPasa de la proteína. Estas mutaciones impiden la hidrólisis de GTP; en consecuencia, Ras queda permanentemente activada, lo que provoca descontrol de la proliferación celular y transformación maligna.

Las proteínas Ras pertenecen a la superfamilia de proteínas de bajo peso molecular que unen e hidrolizan GTP, también llamadas *pequeñas GTPasas*. En la actualidad se han identificado más de cien, clasificadas en cinco familias: Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf y Ran.

Se conocen las funciones de muchas de ellas. Familia *Ras*: principalmente reguladoras de la expresión de genes; *Rho*: modulan la actividad génica y la organización del citoesqueleto; *Rab y Sar1/Arf*: regulan el tráfico vesicular intracelular; *Ran*: controlan el transporte entre núcleo y citoplasma durante las fases G_1, S y G_2 del ciclo celular y la reorganización de microtúbulos en la fase M.

Sistema JAK-STAT

Produce una conexión más directa entre el complejo ligando-receptor y los efectores que la de los sistemas descriptos precedentemente. Las proteínas STAT (de *signal transducers and activators of transcription*) contienen dominios SH2. En células no estimuladas, las proteínas STAT se encuentran en el citosol. La unión de algunas hormonas y citoquinas a receptores asociados a tirosina quinasa tipo Janus (JAK) en el dominio citoplasmático del receptor activa a la quinasa que fosforila restos tirosina, a los cuales se fijan proteínas STAT por sus dominios SH2. La subsiguiente fosforilación de STAT promueve su dimerización y traslación hacia el núcleo, donde estimula la transcripción de sus genes "blanco" (fig. 25-18). La hormona de crecimiento, la prolactina, varias citoquinas que controlan la producción de células de la sangre y el interferón γ utilizan esta vía.

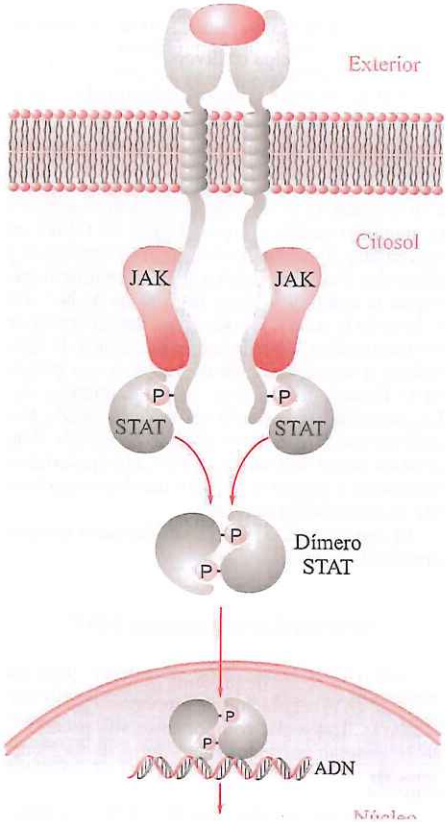


Fig. 25-18. Sistema JAK-STAT.

TOR

TOR (de *target of rapamycin*: blanco o diana de rapamicina) es una serina/treonina quinasa que funciona como núcleo de vías de señalización. Es una proteína de gran masa (alrededor de 300

kDa) evolutivamente conservada desde levaduras a humanos. La de mamíferos es indicada anteponiendo la letra m a las siglas TOR (mTOR).

mTOR se une a diversas proteínas para formar complejos funcionales (mTORC) en los cuales mTOR es el centro catalítico. Se han reconocido dos complejos con mTOR (mTORC1 y mTORC2) que poseen algunos integrantes comunes y otros diferentes, como las unidades reguladoras *Raptor* (*regulatory associated protein of mTOR*), específico de mTORC1, y *Rictor* (*rapamycin insensitive companion of mTOR*) exclusivo de mTORC2.

Los complejos difieren, además de su composición, en propiedades y funciones. La sensibilidad a inhibidores es una característica distintiva.

La *rapamicina*, macrólido producido por la bacteria *Streptomices hygroscopicus*, era conocida como poderoso antimicótico e inmunosupresor; después se comprobó que inhibe selectivamente a mTORC1 pero no a mTORC2. Sin embargo, en algunas líneas celulares, el tratamiento prolongado con rapamicina también puede deprimr la actividad de mTORC2.

mTORC1. Detecta e integra señales intra- y extracelulares a través de cascadas de fosforilación desencadenadas por diversos estímulos: elevada provisión de nutrientes (principalmente aminoácidos), alto nivel de energía en la célula (bajo valor de la relación AMP/ATP) y factores de crecimiento. En la activación de mTORC1 convergen diversas vías de señales, entre ellas la activada por insulina y factor de crecimiento semejante a insulina (IGF-I), de la que forman parte PI3K, PDK1 y AKT; por factores de crecimiento (EGF) , que comprende a MAPK; por niveles de energía, cuyo principal efector es la AMP quinasa (AMPK).

Estos estímulos, excepto AMPK que la deprime, activan la señalización por mTORC1 iniciando la fosforilación de diversos sustratos, entre los cuales se cuentan S6K1 y eIF4E, relacionados con la iniciación de la traducción de ARNm.

La estimulación de esta vía determina aumento de la síntesis de proteínas y de la producción de ribosomas, de la proliferación y crecimiento celular (mayor número y masa de células) e incremento del metabolismo celular.

En contraste, la restricción dietaria (deficiencia de nutrientes), la falta de factores de crecimiento y las señales de estrés celular deprimen la actividad de mTORC1 y promueven la autofagia.

mTORC1 también favorece la lipogénesis. El aumento coordinado de la síntesis de proteínas y de lípidos dependiente de mTOR es factor decisivo que favorece del crecimiento celular.

mTORC2. Es activado por factores de crecimiento (por ej.: IGF-I) e insulina a través de PI3K. A su vez, un importante sustrato de TORC2 es la serina/treonina quinasa AKT (o PKB), lo que muestra la interrelación (*crosstalk*) de estas vías. Cuando la AKT es estimulada por fosforilación, promueve la proliferación, sobrevida y migración celular y modula algunos procesos metabólicos.

La función mejor conocida de mTORC2 es el control de la organización del citoesqueleto de actina.

En invertebrados se ha demostrado que la vía de señales TOR juega un papel importante en la determinación de la duración de la vida. La depresión de la actividad TOR prolonga el tiempo de sobrevida. Esta acción, probada en invertebrados, está siendo estudiada en mamíferos; hasta ahora las evidencias aportadas no permiten conclusiones firmes.

Experimentos en ratones indican que la restricción dietaria favorece la longevidad y retarda la aparición de los deterioros orgánicos relacionados con el envejecimiento. Uno de los mecanismos que explicaría este fenómeno es la depresión de la actividad de mTOR.

En roedores, el tratamiento con rapamicina disminuye la incidencia de tumores y de las alteraciones cardiovasculares que acompañan a la vejez. La rapamicina produce detención del ciclo celular en la fase G_1, inhibe la proliferación, crecimiento y migración celular (esta acción en neoplasias contribuiría a reducir la producción de metástasis) y aumenta la autofagia. El sistema de señales mTOR ha sido relacionado con procesos patológicos como la obesidad, diabetes tipo 2, neurodegeneración y cáncer.

Estos resultados han alentado la realización de pruebas clínicas en humanos; actualmente se efectúan ensayos con rapamicina (en clínica llamada también sirolimus) y análogos en el tratamiento de ciertos tipos de tumores malignos. También se estudia la posibilidad de deprimir la actividad de mTORC con el fin de disminuir la incidencia y gravedad de enfermedades cardiovasculares.

Señal de Ca^{2+}

Normalmente la concentración intracelular de calcio $[Ca^{2+}]_i$ es muy baja (alrededor de 10^{-7} M o 0,1 μM), unas diez mil veces inferior a las concentraciones habituales en el espacio extracelular. Distintos estímulos pueden determinar cambios rápidos en la $[Ca^{2+}]_i$ que sirven como señal para la puesta en marcha de diversos procesos celulares.

La señal de calcio está vinculada a una multitud de procesos fisiológicos, desde la fertilización del huevo y comienzo de un nuevo ser, hasta la muerte celular programada (pág. 703), pasando por cientos de funciones vitales. Los mecanismos responsables de los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ son complejos y finamente regulados (pág. 641).

La $[Ca^{2+}]_i$ resulta del balance ingreso-egreso entre el citosol por un lado y el medio extracelular y depósitos de organelas intracelulares por el otro. En membranas celulares existen transportadores que permiten flujos rápidos de Ca^{2+} y con ello la producción de "pulsos" del catión que cumplen la función de mensajeros de sistemas de señales. Las estructuras responsables de los movimientos de calcio serán consideradas más adelante (pág. 642).

El ingreso de Ca^{2+} desde el líquido extracelular puede responder a diversos estímulos, como despolarización de la membrana plasmática, unión de ligandos desde el exterior o de distintos mensajeros químicos desde el interior.

La liberación de Ca^{2+} desde depósitos internos (retículo sarco-/endoplásmico, mitocondrias, aparato de Golgi) puede ser activada por el mismo calcio y por diversos mensajeros como inositol-1,4,5-trisfosfato (I-1,4,5-P_3), ADP-ribosa cíclico (ADPRc), ácido nicotínico adenina dinucleótido fosfato (NAADP) y esfingosina-1-fosfato, que modulan canales de salida de aquellos depósitos. Las señales que intervienen son variadas. El I-1,4,5-P_3 es producido por activación de fosfolipasa C, de la cual existen cinco isoformas, activadas a partir de distintos receptores: a) acoplados a proteínas G que estimulan PLCβ; b) acoplados a tirosina-quinasa, activan PLCγ; c) activadas por aumento de $[Ca^{2+}]_i$, actúan sobre PLCδ; d) activados a través de Ras-MAPK, sobre PLCε, y e) en espermatozoides existe una PLCζ, integrante de la vía que produce la liberación de Ca^{2+} requerida para la fertilización del óvulo.

Proteínas llamadas STIM (del inglés *stromal interaction molecule*) actúan como coordinadoras de las señales de Ca^{2+} en la célula. Ellas detectan pequeños cambios de los niveles de Ca^{2+}.

El calcio que ingresa en el citosol se une a diversas proteínas. Se ha identificado un gran número de proteínas que fijan Ca^{2+}; entre las que actúan como efectoras pueden mencionarse: troponina C, sinaptotagmina, proteína S100, anexinas, calmodulina. Todas ellas tienen un motivo estructural común, formado por dos hélices α unidas por un tramo en asa con el cual el Ca^{2+} establece múltiples enlaces de coordinación. Las hélices α, designadas E y F, se disponen con sus ejes perpendiculares entre sí. El dominio ha sido denominado "mano EF" porque semeja una mano con el pulgar y el índice extendidos y el dedo mayor flexionado sobre la palma. El pulgar e índice representan las hélices E y F; el mayor, el asa que las conecta y fija el Ca^{2+}.

Calmodulina. Una de las proteínas fijadoras de Ca^{2+} más ampliamente distribuida es la *calmodulina*. Esta proteína, de masa próxima a 17 kDa, de carácter acídico, se encuentra en todos los tejidos. Posee cuatro sitios de unión de Ca^{2+}. En ambos extremos, la molécula presenta estructura globular con dos motivos que fijan Ca^{2+}, compuestos por dominios "manos EF". Entre esos extremos se extiende un largo segmento en hélice α (fig. 25-19). Cuando se une a Ca^{2+}, la calmodulina sufre cambios conformacionales y adquiere capacidad para regular la actividad de numerosas proteínas "blanco", incluidas diversas proteína quinasas que integran cascadas de fosforilación. Estas fosforilaciones modifican la actividad de enzimas, canales de iones y factores de transcripción. Por ejemplo, el factor de transcripción CREB, activado por proteína quinasa A dependiente de AMPc, es también estimulado por

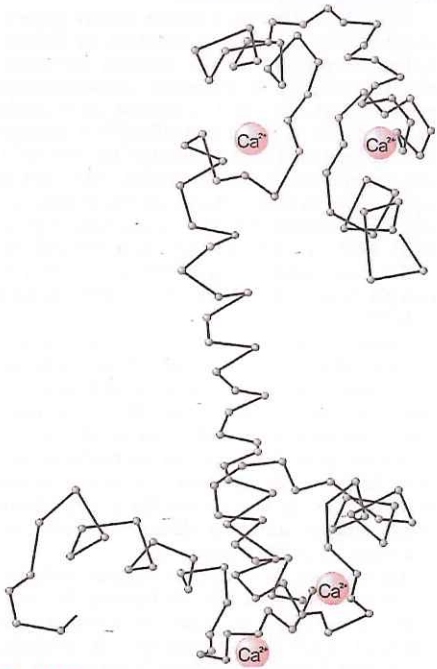


Fig. 25-19. Esquema de la molécula de calmodulina con sus cuatro sitios de unión de calcio ocupados. En la cadena polipeptídica se reresentan sólo los carbonos α.

Ca^{2+}-calmodulina. Ello indica la existencia de interacciones en las vías que utilizan AMPc y Ca^{2+} como mensajeros.

Tabla 25-3. Acciones mediadas por el complejo Ca^{2+}-calmodulina.

Activación de:	Fosfodiesterasa de AMP cíclico
	Adenilciclasa
	ATPasa dependiente de Ca^{2+}
	Guanilato ciclasa
	Fosfolipasa A
	Fosforilasa quinasa
	NAD quinasa
	Proteína quinasa dependiente de Ca^{2+}
	Quinasa de cadena liviana de miosina
Desagregación de microtúbulos	
Liberación de neurotransmisores	

Importancia de las proteína quinasas. En los sistemas de transducción descriptos, las proteína quinasas que transfieren fosforilo a restos serina-treonina o tirosina de proteínas aparecen como un común denominador. La existencia de más de mil enzimas de este tipo en células de mamíferos es un índice de la importancia, diversidad y complejidad de los mecanismos en los cuales participan. Unas dependen de AMPc, otras de GMPc, de diacilglicerol, de Ca^{2+} y de receptores tirosina quinasa. Su acción produce modificación covalente de enzimas y otras proteínas de variada naturaleza y funciones. La fosforilación juega un papel importante en la regulación de sistemas de transporte a través de membranas, en la multiplicación celular, en la modulación de la actividad de síntesis de ácidos nucleicos y proteínas. Esto otorga a las proteína quinasas un papel muy general y trascendente en los procesos biológicos.

Proteína fosfatasas. Las primeras descripciones de sistemas de transmisión de señales destacaron el papel de las proteína quinasas, que eclipsaron inicialmente a las proteína fosfatasas.

Sin embargo, las reacciones de desfosforilación ocupan un lugar de igual importancia que el de las fosforilaciones en procesos de activación-inactivación covalente de proteínas.

Actualmente las fosfatasas son reconocidas como componentes esenciales en los sistemas de transmisión de señales. Existen varias familias de proteína-serina/treonina y proteína-tirosina fosfatasas. Tienen especificidad de sustrato y su actividad puede ser regulada por diversos mecanismos, entre ellos fosforilación-desfosforilación.

Señales redox. Anión superóxido, peróxido de hidrógeno y óxido nítrico son especies reactivas de oxígeno (ROS) que poseen acción deletérea sobre diversos compuestos de las células (ver Cap. 10). Existe también evidencia de efectos benéficos de niveles bajos de esos ROS, actuando como mensajeros potenciales en sistemas de transducción de señales. Como tales, tienen un amplio espectro de actividades que abarca el sistema inmune, la renovación de células madre, el envejecimiento, la oncogénesis y probablemente otros procesos.

Proteínas Wnt. Pertenecen a una gran familia de proteínas secretadas por las células, altamente conservadas a lo largo de la evolución. En humanos se han identificado 19 proteínas Wnt, de 39 a 46 kDa, ricas en residuos cisteína; poseen un ácido graso (palmitato) unido covalentemente. Son iniciadoras de un sistema de transducción de señales que actúa principalmente a distancias cortas, célula a célula. Se unen a receptores de siete segmentos transmembrana, que desencadenan en el citoplasma la activación de efectores y finalmente generan reguladores de los genes diana. Uno de los más importantes de estos efectores es la *β-catenina*, que penetra en el núcleo y actúa como factor de transcripción.

La vía de señales de Wnt tiene un papel muy importante en el desarrollo embrionario de todas las especies animales, actuando sobre las células madre, en la regeneración de tejidos en adultos y en otros procesos. En el sistema nervioso embrionario, las proteínas Wnt controlan la formación de la cresta neural y las etapas subsiguientes de conformación del sistema nervioso. Las Wnt también regulan la apoptosis.

Mutaciones de genes que codifican componentes de la vía de Wnt, pueden promover enfermedades degenerativas y cáncer.

Factores de transcripción FOXO son importantes reguladores de diversos procesos fisiológicos que comprenden metabolismo, ciclo celular, proliferación celular, apoptosis, inflamación, respuesta al estrés oxidativo, longevidad e inmunidad. A su vez son regulados por modificación postranscripcional (fosforilación, acetilación y ubicuitinación). Los factores FOXO son activados por vías de señales como la de fosfoinositol-3-quinasa (AKT), o RAS/MAP quinasas.

Relaciones entre sistemas de transmisión de señales (crosstalk)

Como se ha indicado, las vías de transmisión de señales activadas por unión de ligandos extracelulares a receptores de membrana ponen

en marcha cascadas de proteína-serina/treonina o proteína-tirosina quinasas y fosfatasas que regulan el estado de fosforilación de diversas proteínas en la célula. Con ello controlan funciones tan diversas como actividad de enzimas, canales de iones, crecimiento, diferenciación, multiplicación y sobrevida de las células, respuestas inmunes y otras.

La coordinación de las vías de transmisión de señales se logra a través de conexiones entre distintos sistemas que aseguran su intercomunicación e integración. Los autores de habla inglesa llaman *crosstalk* (conversación cruzada) a la interrelación de diferentes vías.

Entre los muchos ejemplos de interacciones (*crosstalk*) sólo se citarán la activación de la cascada de quinasas MAP por proteínas G, independientemente de Ras-Raf, la inhibición de Raf activada por altos niveles de AMPc o la estimulación por condiciones de estrés o por la vía de Ras del factor de transcripción *Jun*, que comúnmente es activado por la quinasa específica JNK (*c-Jun N-terminal kinase*).

RECEPTORES DE NEUROTRANSMISORES

Los receptores de neurotransmisores son estructuras más o menos complejas, insertas en la membrana plasmática de las células postsinápticas (en algunos casos también en la del terminal presináptico), que selectivamente fijan el transmisor. Todos ellos son glicoproteínas integrales con múltiples segmentos transmembrana.

Investigaciones farmacológicas con compuestos que se unen al receptor y reproducen (agonistas) o bloquean (antagonistas) las acciones del neurotransmisor revelaron una marcada complejidad. Para cada transmisor se detectaron varios subtipos de receptores. La adopción de métodos de biología molecular en el estudio de receptores ha demostrado aún mayor polimorfismo. En las secciones siguientes nos limitaremos a algunos de los receptores mejor conocidos.

Receptores colinérgicos. A comienzos del siglo XX, poco después del reconocimiento de la acetilcolina como intermediario químico en el sistema nervioso, se advirtió que el transmisor desencadenaba dos tipos de respuestas. Algunas acciones eran similares a las ejercidas por la nicotina, mientras otras podían ser reproducidas por la muscarina. Las primeras eran bloqueadas por D-tubocurarina y las segundas por atropina. Estas observaciones llevaron posteriormente a proponer la existencia de dos tipos de receptores, a los cuales se los designó *nicotínicos* y *muscarínicos*, nombres que aún subsisten.

Receptores nicotínicos. Son glicoproteínas pentaméricas cuyas subunidades son proteínas integrales de membrana plasmática de células postsinápticas. En la unión neuromuscular, el receptor está formado por cuatro clases de monómeros: α, β, γ y δ. El α está repetido, ($\alpha_2\beta\gamma\delta$). La masa de los monómeros es de alrededor de 50 kDa. Las cinco subunidades se disponen alrededor de un canal central (fig. 25-20). Visto lateralmente, un receptor nicotínico es un cilindro inserto en forma perpendicular al plano de la membrana. Sobresale más hacia la hendidura sináptica que hacia el citoplasma. En los receptores nicotínicos del sistema nervioso central, el pentámero está integrado por dos subunidades α y tres β ($\alpha_2\beta_3$). Se ha demostrado la existencia de varios tipos de subunidades α y β, lo que da la posibilidad de múltiples combinaciones $\alpha_2\beta_3$.

La estructura de los monómeros del receptor nicotínico es homóloga para todos ellos. Tienen un gran dominio hidrofílico en el extremo N-terminal, que mira hacia la hendidura sináptica, cuatro segmentos hidrofóbicos en hélice transmembrana y dos dominios hidrófilos hacia el citoplasma (fig. 25-21). Se encuentra un sitio de unión de acetilcolina en el dominio hidrofílico externo de cada subunidad α. Por lo tanto, se pueden fijar dos moléculas del neurotransmisor por receptor.

Los receptores nicotínicos funcionan como canales iónicos activados por ligando. Pertenecen a la categoría de receptores ionotrópicos. La

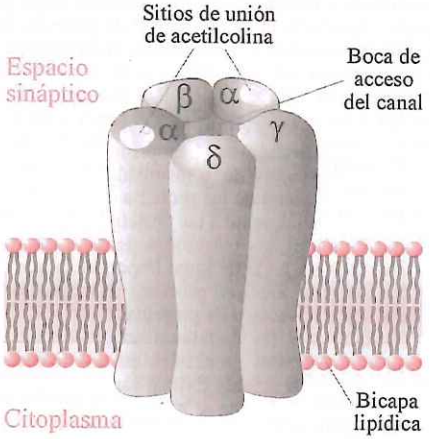


Fig. 25-20. Representación esquemática de un receptor colinérgico nicotínico de unión neuromuscular. Cinco subunidades homólogas (2 α, 1 β, 1 γ, 1 δ) forman el canal iónico.

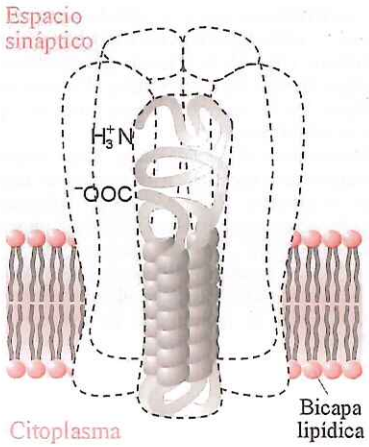


Fig. 25-21. Esquema de una subunidad de receptor nicotínico, constituido por cuatro hélices α transmembrana y un gran dominio N-terminal hacia el espacio sináptico. De las dos asas citoplasmáticas, la mayor es la que une las hélices 3 y 4. Las unidades de receptores GABAérgicos tienen una estructura similar.

unión de acetilcolina provoca la apertura del poro central, permeable a Na^+ y K^+. El ingreso de Na^+ causa despolarización de la membrana y genera un potencial postsináptico excitatorio. Se encuentran en neuronas postsinápticas del sistema nervioso central y ganglios y en la placa motora del músculo.

Receptores muscarínicos. Son glicoproteínas de 80 kDa. El conocimiento de la secuencia de aminoácidos permite establecer el perfil de hidrofobicidad de la cadena e inferir la existencia de siete segmentos de hélices transmembrana (fig. 25-22). El dominio inicial hidrofílico, glicosilado, y las pequeñas asas que conectan las hélices 2-3, 4-5 y 6-7 emergen hacia el espacio sináptico. Tres asas hidrofílicas, de las cuales la más extensa es la que une las hélices 5-6, y el segmento C-terminal sobresalen hacia el citoplasma.

Existen otros receptores con la misma estructura básica; todos se asocian a proteínas G. Pertenecen a una superfamilia probablemente originada a partir de un gen ancestral común.

Estudios farmacológicos habían permitido distinguir tres subtipos de receptores muscarínicos (M1, M2 y M3) con distinta localización y especificidad. Posteriormente, por clonado molecular, se han detectado cinco (m_1 a m_5). M1 a M3 coinciden con los m_1 a m_3. M1 se encuentra en ganglios y células exocrinas; M2 en músculo liso y miocardio y M3 en músculo liso y glándulas.

Todos los receptores muscarínicos ejercen sus acciones por intermedio de proteínas G. Los receptores de número impar (m_1, m_3 y m_5) interactúan con proteína G_q y activan la fosfolipasa C, que cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositolbisfosfato, generando los segundos mensajeros inositoltrisfosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El IP_3 provoca aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólico. Los receptores m_2 y m_4 se acoplan a proteína G_i, que inhibe la adenilato ciclasa y reduce el nivel de AMPc. En miocardio, estos receptores promueven la apertura de canales de K^+ y con ello la hiperpolarización de la membrana. También modulan la actividad de canales de Ca^{2+}.

Receptores adrenérgicos. Son glicoproteínas integrales, homólogas a las de receptores muscarínicos, con siete hélices transmembrana (fig. 25-22). El extremo N-terminal mira hacia el espacio sináptico y está glicosilado. El extremo C-terminal es citoplasmático y puede ser fosforilado por proteína quinasas. El asa que conecta las hélices 5-6 es la porción del receptor que interactúa con proteínas G. En la faz extracelular, los segmentos transmembrana forman un nicho al cual se fija el neurotransmisor.

Inicialmente se distinguieron dos tipos de receptores adrenérgicos: α y β. En cada categoría se reconocieron posteriormente varios subtipos que difieren por su distribución anatómica y su afinidad por distintos fármacos. Los receptores α se dividen en α_1 y α_2; existen variantes de cada uno de ellos. Se han encontrado tres subtipos de receptores β: β_1, β_2 y β_3. Todos los genes han sido clonados (ver pág. 536).

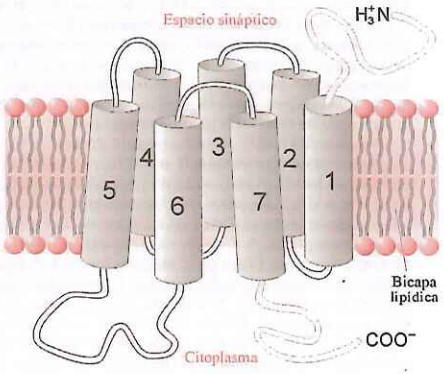


Fig. 25-22. Esquema de la constitución de un recetor colinérgico muscarínico. Posee siete segmentos transmembrana en hélice (representados como cilindros). Los receptores adrenérgicos dopaminérgicos, la rodopsina y todos los acoplados a proteínas G tienen una estructura básica similar.

Las acciones de los receptores β son mediadas por proteína G_s. Activan la adenilato ciclasa y elevan el nivel de AMPc en la célula. También promueven la apertura de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática de músculos cardíaco y esquelético.

Los receptores α_1 interactúan con una proteína G_q que activa la fosfolipasa C y forma los segundos mensajeros IP_3 y DAG. El resultado es la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares y la activación de proteína quinasas.

La fijación del transmisor a receptores α_2 los acopla al sistema de señales con proteína G_i. Inhibe la adenilato ciclasa, reduce el nivel de AMPc e inactiva la proteína quinasa dependiente de ese mensajero.

Receptores dopaminérgicos. Pertenecen a la superfamilia que comprende a los muscarínicos y adrenérgicos, con siete hélices transmembrana (fig. 25-22). Están relacionados con proteína G, son metabotrópicos. Existen varios subtipos; los D_1 interactúan con proteína G_s; los D_2 son inhibitorios.

Receptores GABAérgicos. Son estructuras pentaméricas homólogas a los receptores colinérgicos nicotínicos. Cada una de las subunidades constituyentes presenta cuatro hélices transmembrana (fig. 25-21). Los receptores $GABA_A$ son ionotrópicos, forman canales de iones accionados por el ligando. Permiten el ingreso de Cl^- e hiperpolarizan la membrana; de ahí su acción inhibitoria.

RESUMEN

Receptores. Se localizan en el interior de la célula o en la membrana plasmática. *R intracelulares*. A ellos se unen hormonas esteroides, tiroideas, metabolitos activos de vitamina D y retinoides, moléculas apolares o poco polares, que atraviesan membranas y se unen a sus receptores localizados en el núcleo y también en el citosol. Los HR se dimerizan y se fijan a secuencias específicas del ADN (elementos de respuesta a hormona, HRE), modificando la actividad de transcripción. Los R intracelulares pertenecen a una familia de moléculas homólogas que presentan tres dominios: 1. Hipervariable, que participa en acciones reguladoras de la transcripción. 2. Central, con dos dedos de zinc, que interactúa con secuencias definidas del ADN. 3. Terminal, en el cual se encuentra el sitio de unión de la hormona. *R de membrana*. Al formarse el complejo HR se producen cambios que se transmiten a otras proteínas intermediarias en sistemas de señales. Existen varios tipos: a) *R asociados a proteínas G*, presentan siete hélices transmembrana. El complejo HR interactúa con proteínas G. Estas son heterotrímeros αβγ. El trímero es inactivo, con α unida a GDP. La interacción HR-proteína G provoca el reemplazo de GDP por GTP, la subunidad α-GTP se separa y puede influir sobre la siguiente proteína efectora en el sistema. El dímero βγ también puede actuar como intermediario en señalización. El GTP en α es hidrolizado a GDP y P_i, vuelve a quedar α unida a GDP y se reconstituye el trímero inactivo αβγ. Existen distintas clases de proteínas G. b) *R proteína-tirosina quinasa* (TK), comprenden *R con actividad TK intrínseca*, constituidos por un segmento extracelular con el sitio de unión del ligando, una hélice transmembrana y una porción citoplásmica que contiene la TK. La formación del complejo HR promueve su dimerización, se activa TK que fosforila al propio receptor y favorece la unión al mismo de proteínas con dominio SH2, y *R asociados a TK extrínseca*, son semejantes a los anteriores, pero sin sitio catalítico propio. La tirosina quinasa se asocia cuando se ha formado el complejo HR. *R ligados a guanilato ciclasa*. Promueven la formación de GMP-3',5'-cíclico a partir de GTP.

Sistemas de transmisión de señales. *1. Del AMP-3',5'-cíclico*. La hormona se une a un receptor de 7 pasos transmembrana asociado a proteína G_s o G_i. La subunidad α-GTP interactúa con *adenilato ciclasa*, que cataliza la conversión de ATP en AMP-3',5'-cíclico (AMPc), considerado segundo mensajero en el sistema (la hormona es el primero). Existen subunidades α_s, estimulantes, y α_i, inhibitorias. Cuando interviene la α_i se eleva el nivel de AMPc, lo que a su vez activa a la proteína quinasa A. Esta enzima en estado inactivo es un tetrámero formado por dos subunidades catalíticas (C) y dos reguladoras (R). El AMPc se une a las subunidades R, que se separan de las C. Las subunidades C libres son activas. El AMPc es un mensajero plurivalente que provoca respuestas muy distintas en diferentes células. La inactivación de AMPc es efectuada por *fosfodiesterasa*. *2. Del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato* (FIP_2). Se inicia con la unión de la H a un R asociado a proteína G_q. Al activarse, la subunidad α_q se une a GTP, se separa del trímero αβγ y estimula a la *fosfolipasa C*, la cual hidroliza FIP_2 de la membrana en inositol-1,4,5-trisfosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG), que actúan como segundos mensajeros. IP_3 abre canales de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico y eleva el nivel del catión en el citosol; DAG activa la *proteína quinasa C*. *3. Del GMP-3',5'-cíclico*. Se genera a partir de GTP por acción de la *guanilato ciclasa*. Produce activación de proteína quinasas relacionadas con el desarrollo y proliferación celular. *4. De Ras-quinasas MAP*. Un receptor TK activado por el ligando une proteínas con dominios SH2 (ej.: Grb), la que se asocia a otra (Sos). El complejo Grb-Sos activa a la proteína Ras (se reemplaza GDP por GTP), que inicia una cascada de MAP quinasas (ej.: Raf-MEK-ERK) que finalmente activa otras proteína quinasas en el citosol o factores de transcripción en el núcleo. Las proteínas Ras pertenecen a la superfamilia de "pequeñas GTPasas". *5. De JAK-STAT*. Al activarse el R asociado a TK

tipo Janus (JAK) se fosforilan restos tirosina a los cuales se fijan proteínas STAT (contienen dominios SH2). Las STAT fosforiladas dimerizan y penetran en el núcleo, donde influyen sobre el proceso de transcripción. *6. TOR* (en mamíferos mTOR) forma complejos con otras proteínas (mTORC1 y mTorcC2). TORC1 es activado por altos niveles de nutrientes y energía y factores de crecimiento. A través de cascadas de fosforilaciones activa el crecimiento y proliferación celular. TORC2, activado por insulina e IGF1. Una de sus acciones es la organización del citoesqueleto de actina. *7. Señal de* Ca^{2+}. Diferentes estímulos pueden determinar aumentos bruscos de Ca^{2+} en citosol que sirven como señal para la regulación de muchas funciones celulares. El Ca^{2+} ingresa desde el espacio extracelular o depósitos intracelulares y se une a diversas proteínas; una de las más ampliamente distribuidas es la *calmodulina*. Cuando se une a Ca^{2+}, la calmodulina sufre cambios conformacionales que le permiten activar proteínas efectoras.

Receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR). Receptor nuclear; actúa como factor de transcripción. Se han identificado tres tipos. Actúan como reguladores de vías metabólicas y del ciclo celular.

Receptores del sistema nervioso: son glicoproteínas con múltiples segmentos transmembrana. *Colinérgicos. Nicotínicos*: pentámero; en el músculo su composición es $\alpha_2\beta\gamma\delta$; las cinco subunidades constituyentes forman un canal. Cada monómero α tiene un sitio de unión de acetilcolina. Funcionan como canales iónicos activados por ligando (ionotrópicos). La unión de acetilcolina provoca la apertura del poro central, permeable a Na^+ y K^+. Se produce despolarización y se genera un potencial postsináptico excitatorio. *Muscarínicos*: tienen 7 segmentos en hélice transmembrana. Se distinguen 5 subtipos. Ejercen sus acciones por intermedio de proteínas G (metabotrópicos); m_1, m_3 y m_5 interactúan con proteína G_q que activa a la fosfolipasa C y genera IP_3 y DAG, m_2 y m_4 se acoplan con proteína G_i, inhiben la adenilato ciclasa. *Adrenérgicos*: homólogos a los muscarínicos; los β se acoplan a proteína G_s, elevan niveles de AMPc. Los α_1 asociados a proteína G_q que activa fosfolipasa C. Los α_2 utilizan como mediadores proteínas G_i, reducen los niveles de AMP_c. *Dopaminérgicos*: homólogos a los muscarínicos y adrenérgicos. Los D_1 interactúan con proteína G_s; los D_2 son inhibitorios. *GABAérgicos*: homólogos a los nicotínicos (ionotrópicos). Forman canales iónicos que permiten la entrada de Cl^-, produciendo hiperpolarización; son inhibitorios.

BIBLIOGRAFÍA

Ahmadian M., Suh J.M., Hah N., Liddle E., Atkins A.R., Downes M., Evans R.M. (2013). PPAR signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nature Medicine*, 19: 557-566.

Becker K.L. (2002). *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*, 3ra. Ed., J.P. Lippincott, Filadelfia.

Birnbaumer L. (2007). The discovery of signal transduction by G proteins. *Biochimica et Biohysica Acta*, 1768: 756-771.

Coleman M.L., Marshall C.J., Olson M.F. (2004). Ras and Rho GTPases in G1-phase cell cycle regulation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5: 355-366.

Escribá P.V. (Ed.). (2007). G protein-coupled receptors, signaling mechanisms and pathophysiological relevance. *Biochimica Biophysica Acta. Biomembranes*, 1768: 747-898.

Foster K G., Fingar D.C. (2010). Mammalian target of rapamycin (mTOR) conducting the cellular signaling symphony. *Journal of Biological Chemistry*, 285: 14071-14077.

Hancock J.F. (2003). Ras proteins: Different signals from different location. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4: 373-385.

Holmström K.H., Finkel T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling. *Nature Reviews*. Molecular Cell Biology, 15: 411-421.

Hubbard S.R., Till J.H. (2000). Protein tyrosine kinase structure and function. *Annual Review of Biochemistry*, 69: 373-398.

Klaus A., Birchmeier N. (2008). Wnt signaling and its impact on development and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8: 397-398.

Kronenberg H.M. (2008). *Williams Textbook of Endocrinology*. 11ma. Ed., Saunders Elsevier, Filadelfia.

Laplante M., Sabatini D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149: 274-293.

Reddy J.K., Hashimoto T. (2001). Peroxisomal β-oxidation and peroxisome proliferator activated receptor. An adaptive metabolic system. *Annual Review of Nutrition*, 21: 193-230.

Rockman H.A., Koch W.J., Lefkowitz R.J. (2002). Seven transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*, 415: 206-212.

Rosen H., Stevens R.C., Hanson M., Roberts E. (2013). Sphingosine-1-phosphate and its receptor: Structure, signaling, and influence. *Annual Review of Biochemistry*, 82: 637-662.

Stanfel M.N., Shameh L.S., Kaeberlein M., Kennedy B.K. (2009). The TOR pathway comes of age. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790:1067-1074.

Takai Y., Sasaki T., Matosaki T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiological Reviews*, 81: 153-208.

Taleisnik S. (2006). *Receptores Celulares y la Transducción de Señales*. Encuentro Grupo Editor, Córdoba.

Wang Y., Zhow Y., Graves D.T. (2014). FOXO transcription factors: Their clinical significance and regulation. *BioMed Research International*, 2014: 1-13.

Wilson M.S., Livermore T.M., Saiardi A. (2013). Inositol pyrophosphates: between signalling and metabolism. *Biochemical Journal*, 452: 369-379.

CAPÍTULO 26

Bases bioquímicas de la endocrinología (II). Hormonas y otros intermediarios químicos

Hormonas: Naturaleza química

De acuerdo con su naturaleza química, las hormonas pueden clasificarse en cinco categorías:

1. **Esteroides.** Químicamente relacionados con el ciclopentanoperhidrofenantreno; derivan del colesterol. A este grupo pertenecen glucocorticoides, aldosterona y andrógenos de la corteza suprarrenal, estrógenos y progesterona del ovario, testosterona del testículo y 1,25-(OH_2)-D_3, metabolito activo de vitamina D_3. Debido a su carácter poco polar, estas hormonas atraviesan con facilidad las membranas celulares. En sangre deben ser transportadas en asociación con proteínas.

2. **Derivados de aminoácidos.** Adrenalina o epinefrina y noradrenalina o norepinefrina (catecolaminas) de médula suprarrenal y tiroxina y triyodotironina de tiroides son derivados de tirosina; la melatonina de glándula pineal es producida a partir de triptófano. Las catecolaminas son solubles en medio acuoso; en sangre circulan libres o débilmente unidas a albúmina. No penetran en las células blanco. Las hormonas tiroideas son poco polares y atraviesan membranas por difusión.

3. **Derivados de ácidos grasos.** Prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, llamados genéricamente *eicosanoides*, se originan de ácidos grasos poliinsaturados. El ácido araquidónico es el precursor más importante. Sus acciones primarias son de tipo autocrino o paracrino.

4. **Péptidos.** En esta categoría se incluyen los factores reguladores y las hormonas vasopresina y oxitocina del hipotálamo; adrenocorticotrofina (ACTH) y hormona melanocito estimulante (MSH) de adenohipófisis; glucagón del páncreas; gastrina, secretina, pancreozimina y otras hormonas del tracto gastrointestinal y calcitonina de tiroides.

5. **Proteínas.** La hormona paratiroidea, la insulina del páncreas y las hormonas prolactina (PR), foliculoestimulante (FSH), luteinizante (LH) o estimulante de células intersticiales (ICSH), de crecimiento (GH) y tirotrófica (TSH), todas de adenohipófisis, son de naturaleza proteínica.

Las hormonas proteicas y peptídicas son sintetizadas en ribosomas asociados al retículo endoplásmico rugoso. Inicialmente se produce una prohormona o una preprohormona. La eliminación del péptido del extremo N-terminal de la preprohormona por la peptidasa de la señal (pág. 477) libera prohormona en la luz del retículo endoplásmico, donde se separa otro segmento de la cadena para dar el producto final u hormona "madura". A veces, el precursor original contiene en su cadena múltiples factores activos. Es el caso de la proopiomelanocortina, a partir de la cual se generan, por hidrólisis, una variedad de agentes hormonales (pág. 514). Las hormonas proteicas y peptídicas se almacenan en vesículas intracelulares y son liberadas por exocitosis. Son solubles en medio acuoso y, en su mayoría, circulan libres en sangre.

Tipos de acciones promovidas por hormonas

Pese a la diversidad de hormonas y a la variedad de respuestas que cada una de ellas suscita en el órgano efector, las acciones pueden agruparse en tres categorías relacionadas con: 1) transporte de membranas, 2) actividad de enzimas presentes en la célula y 3) síntesis de proteínas.

1. *Acción sobre mecanismos de transporte en membranas celulares.* Algunas hormonas modifican el flujo de metabolitos o iones a través

de membranas por su acción sobre sistemas de transporte o canales iónicos.

2. *Modificación de la actividad enzimática.* En animales intactos o en tejidos aislados, inmediatamente después del tratamiento con hormonas se observan cambios en la actividad de determinadas enzimas. Esta acción es rápida y de carácter transitorio. Se ejerce principalmente a nivel de enzimas regulatorias cuya actividad es aumentada o disminuida por modificación covalente.

3. *Acción sobre la síntesis de proteínas.* Muchas hormonas modulan la síntesis de enzimas y otras proteínas. Actúan predominantemente a nivel del ADN nuclear, regulando el proceso de transcripción génica. Esta acción requiere más tiempo para manifestarse que la anterior y tiene efectos más sostenidos.

La misma hormona puede poner en marcha más de uno de los mecanismos señalados. Por ejemplo, la insulina favorece el transporte de determinados metabolitos a través de membranas, modifica la actividad de enzimas y también la síntesis de proteínas.

Todos los mecanismos están estrechamente relacionados y dan lugar a interacciones. Por ejemplo, los efectos sobre sistemas de transporte de membrana pueden determinar el ingreso a la célula de sustancias con capacidad para modular la actividad de enzimas o la transcripción en el núcleo. Asimismo un efecto directo sobre enzimas determina cambios en la disponibilidad de sustratos para el funcionamiento de vías metabólicas o afecta procesos de síntesis de proteínas o de transporte de membrana. Esta interrelación de los distintos mecanismos torna difícil, a veces, establecer con exactitud cuál es la acción primaria asignable a la hormona.

Propiedades generales de las hormonas

Actividad. Las hormonas actúan en concentraciones muy pequeñas; una ínfima cantidad es capaz de generar respuestas notablemente intensas. En este sentido, se semejan a los catalizadores biológicos. Comúnmente los niveles de hormona en sangre circulante suelen ser muy bajos. Por ejemplo, las hormonas proteicas alcanzan concentraciones en plasma que oscilan entre 10^{-12} y 10^{-9} M (de pico a nanomolar), mientras las hormonas esteroides presentan concentraciones de 10^{-9} a 10^{-6} M (de nano a micromolar).

Vida media. Debido a su actividad biológica, las hormonas deben ser degradadas y convertidas en productos inactivos, pues su acumulación en el organismo tiene efectos perniciosos. El tiempo promedio de duración de las hormonas varía de una a otra y puede oscilar entre segundos y días.

Velocidad y ritmo de secreción. En general, la secreción de hormonas no es un proceso uniforme y sostenido. Frecuentemente responde a estímulos del ambiente o del medio interno. Por ejemplo, la secreción de insulina es promovida por incrementos en la concentración de glucosa en sangre. La liberación de muchas hormonas presenta variaciones cíclicas, como las de hormonas gonadotróficas de hipófisis y hormonas ováricas durante el ciclo sexual femenino, o las de esteroides de corteza adrenal durante cada período de 24 horas (variaciones circadianas).

Especificidad. Una de las propiedades más notables de las hormonas es su gran especificidad de acción. Una hormona determinada sólo actúa sobre las células que constituyen su "blanco", "objetivo" o "diana". La hormona es vertida a la circulación general y alcanza a todos los tejidos; sin embargo, su acción se ejerce únicamente a nivel de un número limitado de células en las cuales provoca un tipo definido de respuesta. Esta especificidad, como se ha visto en el capítulo anterior, se debe a la existencia en esas células de receptores que permiten la fijación selectiva de intermediarios químicos.

Métodos de determinación de hormonas

Es de mucho interés la determinación de la cantidad de hormona en una muestra de plasma u otro medio biológico. Con ese propósito se han diseñado muchos métodos. A continuación se hará una breve referencia a distintos tipos de técnicas disponibles.

Ensayo biológico. Se hace actuar la preparación cuyo contenido de hormona se desea determinar sobre un organismo intacto (*in vivo*) o sobre órganos aislados o cultivos de células vivas (*in vitro*). La magnitud del efecto provocado es directamente proporcional a la concentración de hormona en la preparación. Este tipo de ensayo es valioso, pues mide directamente la actividad funcional, pero carece de precisión y sensibilidad. Es poco usado en la actualidad.

Ensayo químico. Se utilizan las técnicas corrientes de aislamiento y purificación, tales como cromatografía, electroforesis, extracción fraccionada con diferentes solventes, y posterior determinación de la hormona mediante métodos químicos específicos. Con estas técnicas se obtiene una medida de la cantidad absoluta de hormona. En general, tienen el inconveniente de ser muy

laboriosos y no siempre aplicables a hormonas de naturaleza proteínica. Por otra parte, la sensibilidad de algunas de estas técnicas no alcanza a detectar concentraciones tan bajas como las de muchas hormonas.

Los principales métodos utilizados actualmente son los inmunoensayos, la cromatografía de alta "performance" y la espectrometría de masa.

Inmunoensayo. Se basa en la competencia entre la hormona presente en una muestra y la misma hormona "marcada" por fijarse a los sitios de unión de un anticuerpo específico.

Las proteínas fijadoras son anticuerpos policlonales o monoclonales obtenidos de animales inmunizados con la hormona a determinar. Estos se obtienen con hormonas peptídicas que actúan como antígeno; para las de molécula pequeña, no antigénicas, se las debe fijar previamente a proteínas séricas que normalmente transportan la hormona en sangre y, por lo tanto, se unen específicamente a ella.

La hormona es marcada o rotulada con un isótopo radiactivo (generalmente ^{125}I), en cuyo caso se habla de *radioinmunoensayo* (RIA) o un compuesto que pueda ser determinado por colorimetría, fluorometría o quimioluminiscencia.

Los componentes de la mezcla de ensayo en estas técnicas competitivas son: 1) la hormona "marcada" en cantidad conocida, 2) la muestra con la hormona cuya concentración se desea medir (no marcada) y solución del anticuerpo específico, en número menor que el total de hormona en la mezcla.

La hormona rotulada y la de la muestra de hormona no marcada compiten por su unión al anticuerpo. La radiactividad (o los índices colorimétrico, de fluorescencia, de quimioluminiscencia) en la fracción que queda libre en la mezcla es directamente proporcional a la concentración de ésta en la muestra. El método es extraordinariamente sensible y permite determinar concentraciones de hormona de menos de 1 nanogramo (10^{-9} g) por mL. Se requieren calibraciones previas con cantidades conocidas de hormona.

El método ELISA (de *enzyme-linked immunosorbent assay*) es tan sensible como el radioinmunoensayo. La muestra de hormona se pone en contacto con un anticuerpo específico acoplado a una enzima (peroxidasa). La formación de complejos hormona-anticuerpo está directamente relacionada con la cantidad de hormona presente y puede ser medida por una reacción colorimétrica catalizada por la peroxidasa.

Se han desarrollado otras técnicas llamadas *inmunométricas*; utilizan dos anticuerpos monoclonales que reconocen diferentes sitios o epitopos de la hormona, lo que aumenta la especificidad de la determinación. El primer anticuerpo, fijado a una matriz sólida, debe estar en exceso con relación a la hormona en la muestra. Después de agregar ésta, la hormona se une al anticuerpo; luego se agrega el segundo anticuerpo, marcado para permitir su medición. La hormona queda entre los dos anticuerpos, razón por la cual a esta técnica también se la llama "sándwich". La cantidad fijada del segundo anticuerpo es proporcional a la concentración de hormona.

GLÁNDULAS DE SECRECIÓN INTERNA Y ÓRGANOS PRODUCTORES DE HORMONAS E INTERMEDIARIOS QUÍMICOS

HIPÓFISIS

Embriológica, anatómica y funcionalmente, la glándula pituitaria o hipófisis está compuesta por dos porciones bien diferenciadas: el lóbulo anterior o adenohipófisis y el lóbulo posterior o neurohipófisis. En vertebrados inferiores se distingue además un lóbulo intermedio.

La neurohipófisis está unida a la base del cerebro, más precisamente al hipotálamo, por el tallo infundibular, el cual contiene fibras nerviosas y vasos sanguíneos de un sistema porta. Estas estructuras establecen una importante conexión, no sólo anatómica sino también funcional, entre hipotálamo e hipófisis.

La extirpación de la pituitaria (hipofisectomía) en animales jóvenes produce detención del crecimiento y ausencia de desarrollo de las glándulas sexuales. Si la hipofisectomía se practica en animales adultos, se produce atrofia de órganos y glándulas sexuales e involución de la tiroides y la corteza adrenal y alteraciones metabólicas generales. Estos efectos se deben a que la hipófisis produce hormonas tróficas o trofinas que estimulan el funcionamiento de otras glándulas de secreción interna.

A su vez, la secreción de hormonas hipofisarias es controlada por factores reguladores producidos en el hipotálamo.

Hormonas reguladoras del hipotálamo

Las relaciones anatómicas entre hipotálamo e hipófisis, tanto en irrigación sanguínea como en conexiones nerviosas, son importantes. Capilares sanguíneos de la eminencia media forman vasos

portales que se dirigen por el tallo infundibular hacia la adenohipófisis, donde vuelven a ramificarse en capilares. En estos capilares se vierten factores generados en el hipotálamo que regulan la liberación de hormonas en la hipófisis anterior. Neuronas cuyos cuerpos se encuentran en núcleos del hipotálamo producen hormonas que son conducidas por sus axones a través del tallo infundibular y las liberan en sus terminaciones nerviosas en la neurohipófisis.

Se conocen nueve factores u hormonas reguladoras de la hipófisis anterior producidos en el hipotálamo. Todos ellos son de naturaleza peptídica (excepto la dopamina), regulan la liberación de las trofinas de la adenohipófisis y poseen capacidad para modificar la diferenciación y la síntesis de esas hormonas. Algunos de ellos actúan sobre más de una hormona pituitaria.

Existen factores estimulantes de la secreción de todas las hormonas producidas en la hipófisis y factores inhibitorios para sólo tres de ellas, a saber, hormona de crecimiento, prolactina y hormona melanocito estimulante. Estos factores inhibitorios son necesarios porque las tres hormonas mencionadas no son controladas por retroalimentación. En cambio, la secreción de las restantes trofinas es inhibida cuando aumentan los niveles sanguíneos del producto hormonal de la glándula que estimulan (retroalimentación negativa).

La secreción de las hormonas liberadoras, a su vez, es regulada por un conjunto de neuronas que llegan al hipotálamo. La actividad endocrina del hipotálamo puede ser influida por estímulos neurales y psíquicos. Ello explica la capacidad de estos estímulos de provocar respuestas endocrinas o metabólicas.

La figura 26-1 presenta los factores reguladores del hipotálamo y las hormonas hipofisarias cuya síntesis y liberación controlan.

Las hormonas liberadoras [en inglés *releasing hormones* (RH) y las inhibidoras *inhibiting hormones* (IH)] son:

Liberadora de corticotrofina (CRH) o corticoliberina. Primer factor regulador descubierto en el hipotálamo. Estimula la liberación de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) en la adenohipófisis y de otros productos generados por la molécula precursora proopiomelanocortina (ver más adelante).

Es un polipéptido de 41 aminoácidos, derivado de un precursor de 196.

La hormona antidiurética (ADH) de neurohipófisis y la angiotensina II potencian la acción de CRH; la oxitocina la inhibe.

Se ha descripto, en suero y en varios tipos celulares, una proteína de unión a CRH.

Hormonas del hipotálamo		Hormonas de la adenohipófisis
Liberadora de ACTH (CRH)	⊕ →	Adrenocorticotrofina (ACTH) y β-endorfina
Liberadora de TSH (TRH)	⊕ →	Tiroestimulante (TSH)
Liberadora de LH y FSH (LHRH)	⊕ →	Luteinizante (LH) y foliculoestimulante (FSH)
Liberadora de GH (GHRH)	⊕ →	Somatotrofina u hormona de crecimiento (GH)
Inhibidora de GH o Somatostatina (GHIH)	⊖ →	Somatotrofina u hormona de crecimiento (GH)
Liberadora de PR (PRRH)	⊕ →	Prolactina (PR)
Inhibidora de PR (PRIH)	⊖ →	Prolactina (PR)
Liberadora de MSH (MSRH)	⊕ →	Melanocitoestimulante (MSH)
Inhibidora de MSH (MSIH)	⊖ →	Melanocitoestimulante (MSH)

Fig. 26-1. Hormonas reguladoras del hipotálamo.

La CRH también es segregada en la placenta humana.

Liberadora de tirotrofina (TRH). Es la principal reguladora de la secreción de hormona tiroestimulante. Es un tripéptido (piroglutamil-histidil-prolinamida) (fig. 26-2). Deriva de una molécula precursora de 242 aminoácidos (29 kDa) que contiene seis copias de la secuencia Gln-His-Pro-Gly, de las cuales se genera TRH por ciclización del glutamilo y amidación del resto prolina.

Liberadora de hormonas gonadotróficas (GnRH). El mismo factor actúa como liberador de hormonas luteinizante (LH) y foliculoestimulante (FSH). La existencia de esta hormona explica la influencia de estímulos nerviosos sobre el control de la función gonadal.

Es un decapéptido lineal; como el tripéptido TRH, tiene un resto piroglutámico en el extremo N-terminal y una función amida en el C-terminal.

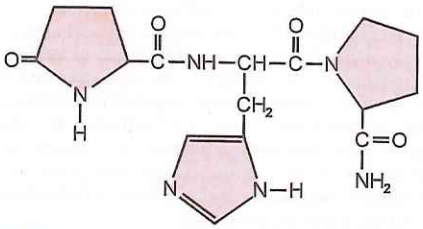


Fig. 26-2. Hormona liberadora de tirotrofina.

Deriva de una proteína precursora de 92 aminoácidos. El mismo gen de LHRH codifica un polipéptido de 56 aminoácidos, llamado *péptido asociado a GnRH* o GAP, que tendría actividad liberadora de prolactina.

Reguladoras de prolactina (PRRH y PRIH). Se ha propuesto la existencia de una hormona liberadora (PRRH) y otra inhibidora (PRIH) de la síntesis y secreción de prolactina (PRL) en adenohipófisis. Hasta ahora no ha podido aislarse una PRRH. Los factores estimulantes de la liberación de PRL mejor conocidos son la hormona liberadora de tirotrofina (TRH), oxitocina y péptido intestinal vasoactivo (VIP) .

La PRIH es identificada con la *dopamina*. El neurotransmisor ácido γ-aminobutírico (GABA) y vías colinérgicas también inhiben la liberación de prolactina.

Reguladoras de la hormona de crecimiento (GHRH y GHIH). El factor liberador (GHRH) es un péptido de 44 aminoácidos derivado de una proteína precursora de 108. La actividad biológica de este factor reside en los primeros 29 aminoácidos. Tiene homología con otros péptidos como el glucagón, la secretina, el péptido intestinal vasoactivo y otros.

El factor inhibidor (GHIH), también llamado *somatostatina*, es un péptido derivado de un precursor de 116 aminoácidos, cuyo procesamiento resulta en la formación de dos péptidos, uno de catorce aminoácidos (somatostatina 14) y de otro de veintiocho aminoácidos (somatostatina 28) que es una extensión del primero en su extremo N-terminal. Tiene estructura cíclica debida a la presencia de dos restos cisteína que forman un puente disulfuro. Pertenece a una familia de péptidos derivados del mismo gen por procesamiento alternativo del ARNm y modificaciones postraducción del propéptido.

Se la ha encontrado no sólo en el hipotálamo sino también en las células D o δ de los islotes de Langerhans del páncreas, la mucosa gastrointestinal y las células C de tiroides. La somatostatina 14 es la principal en hipotálamo, mientras la 28 lo es en el intestino.

La *somatostatina* posee acción inhibitoria de la síntesis y secreción de hormona de crecimiento o somatotrofina en la adenohipófisis y, además, una extensa gama de acciones inhibitorias sobre: a) secreción de insulina y glucagón en páncreas, b) secreción de hormona tiroestimulante de adenohipófisis inducida por TRH, c) secreción de gastrina y secretina.

Reguladoras de hormona melanocitoestimulante (MSRH y MSIH). Existe una hormona liberadora (MSRH) y otra inhibidora (MSIH). Ambas son péptidos pequeños. El primero es un pentapéptido cuya secuencia es idéntica a la porción inicial de la oxitocina, hormona del hipotálamo liberada por el lóbulo posterior de la hipófisis. La hormona inhibidora es un tripéptido que corresponde a los tres aminoácidos del extremo C-terminal de la oxitocina.

Mecanismo de acción de factores liberadores. Los péptidos liberadores se unen a receptores específicos de membrana de las células "blanco". Todos tienen receptores con siete hélices transmembrana, acoplados a proteínas G. Activan una o más vías de transducción de señales. Una de estas vías comprende proteína G_s, activación de adenilato ciclasa, aumento de niveles de AMPc y estimulación de proteína quinasa A, la cual fosforila factores responsables de la secreción de hormona. El incremento de AMPc también puede producir apertura de canales de Ca^{2+}. La elevación del Ca^{2+} intracelular es otro factor estimulante de la secreción. Las GnRH utilizan esta vía.

TRH y LHRH se fijan a receptores acoplados a proteína G_q, estimulan fosfolipasa C, que genera los segundos mensajeros inositoltrisfosfato (IP_3) (eleva la concentración de Ca^{2+} citosólico) y diacilglicerol (DAG) (activa la proteína quinasa C). La hidrólisis de DAG produce araquidonato, del cual se originan eicosanoides. Las prostaglandinas activan también la liberación de hormonas de crecimiento (GH) y adrenocorticotrófica (ACTH). Los leucotrienos estimulan la secreción de gonadotrofinas.

Somatostatina y dopamina, factores inhibitorios, actúan en parte deprimiendo la adenilato ciclasa (receptores asociados a proteína G_i). La acción de los factores liberadores e inhibidores es muy rápida; es notable en menos de un minuto.

ADENOHIPÓFISIS

Una de las características más salientes de la adenohipófisis es la elaboración de hormonas, llamadas tróficas o trofinas, que estimulan la síntesis y secreción de hormonas en otras glándulas endocrinas.

Se han identificado distintos tipos celulares en la hipófisis anterior: células corticotropas, tirotropas, gonadotropas, lactotropas, y somatotropas son las encargadas de la secreción de hormona adrenocorticotrófica (ACTH), tiroestimulante (TSH), gonadotrofinas (LH y FSH), prolactina (PRL) y de crecimiento (GH) respectivamente. Todas las hormonas de la adenohipófisis son de naturaleza polipeptídica.

La mayoría de las hormonas tróficas está sujeta a control positivo por los factores liberadores del hipotálamo y a inhibición por retroalimentación. La concentración en sangre del producto hormonal de la glándula estimulada regula la secreción de la trofina correspondiente actuando a nivel de hipófisis o de hipotálamo.

Un aumento en la concentración plasmática de esteroides sexuales, de glucocorticoides o de tiroxina inhibe la liberación de gonadotrofinas, corticotrofina u hormona tiroestimulante, respectivamente.

Proopiomelanocortina. Las células corticotropas producen una proteína precursora, llamada *preproopiomelanocortina*, la cual es fragmentada en diferentes péptidos biológicamente activos.

La preproopiomelanocortina, de unos 280 aminoácidos, pierde la porción inicial (péptido líder o señal) para dar *proopiomelanocortina* (POMC). Esta proteína sufre hidrólisis en enlaces definidos de su cadena engendrando varias moléculas con actividad hormonal. En algunas de éstas se producen otros cambios postraducción, como acetilación, amidación, metilación, glicosilación.

La POMC se escinde por hidrólisis en dos segmentos; el del extremo N-terminal tiene una extensión de unos 170 aminoácidos y el del extremo C-terminal constituye la β-lipotropina, de 91 (fig. 26-3).

El fragmento N-terminal sufre otra hidrólisis para engendrar un trozo de 39 aminoácidos de su extremo C-terminal, correspondiente a ACTH. En algunas especies, a partir de ACTH se generan dos trozos, uno formado por los aminoácidos 1 a 13, la α-MSH, y un péptido llamado CLIP (de *corticotropin like intermediate lobe peptide*), formado por los aminoácidos 18 a 39. Estos dos péptidos se encuentran en especies con lóbulo intermedio desarrollado, pero no en humanos. La porción restante del fragmento N-terminal después de separar la ACTH se hidroliza en dos sitios para dar un pequeño segmento, la γ-MSH.

El trozo C-terminal de 91 aminoácidos, resultante de la primera hidrólisis de la POMC, es la β-*lipotropina*, secretada por las células corticotropas en cantidades equimolares con el ACTH. La β-lipotropina se hidroliza nuevamente formando γ-*lipotropina* y β-*endorfina* (fig. 26-3). Las β y γ-lipotropinas actúan sobre tejido adiposo; promueven la lipólisis y movilización de ácidos grasos.

La β-*endorfina*, de 31 aminoácidos, puede también escindirse; el segmento que contiene los primeros 17 aminoácidos corresponde a α-*endorfina*. Del extremo N-terminal de ésta se separa un pentapéptido llamado *metencefalina*. Las endorfinas y las encefalinas son péptidos presentes en hipófisis y en sistema nervioso central, con potente acción analgésica. Se fijan a los mismos receptores utilizados por la morfina y otros opiáceos. Están relacionadas con la percepción del dolor.

Sistema melanocortina es un grupo de hormonas de pequeño tamaño, derivadas de la hidrólisis postraducción de la proopiomelanocortina, que incluyen la α, β y γ melanocitoestimulantes y ACTH. Hay evidencias del papel importante de este sistema en la regulación del balance energético y otros procesos neuroendócrinos, como regulación de la presión arterial, ingestión de alimentos, sensación de dolor, etc.

Las hormonas melanocitoestimulante (MSH) son importantes productos del lóbulo medio (pars intermedia) de la hipófisis de peces y batracios, razón por la cual se las ha designado también intermedinas. En estos organismos actúan sobre células pigmentadas o melanocitos de la piel, determinando oscurecimiento de los tegumentos.

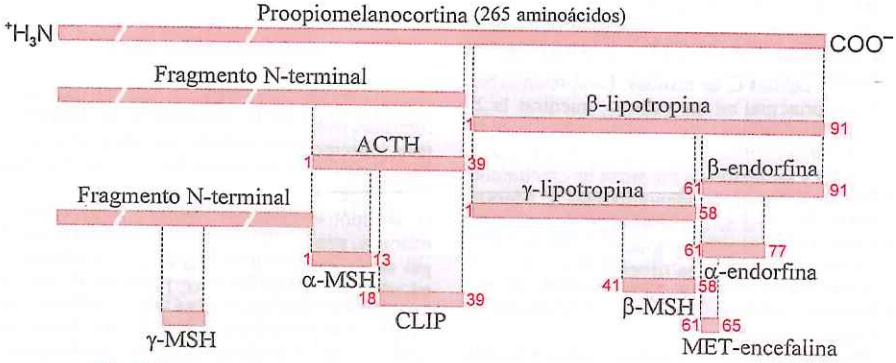


Fig. 26-3. Proopiomelanocortina y productos resultantes de su procesamiento por hidrólisis.

Hormona adrenocorticotrófica (ACTH)

La adenohipófisis produce una trofina que estimula a la corteza adrenal.

La hormona adrenocorticotrófica es un polipéptido constituido por una cadena lineal de 39 aminoácidos, de alrededor de 4.500 Da. El segmento inicial de 16 aminoácidos tiene actividad biológica; el máximo de acción se alcanza con el polipéptido formado por los primeros 23 aminoácidos. La secuencia de esos 23 aminoácidos es la misma para ACTH de todas las especies estudiadas, incluida la humana. Las variaciones entre especies residen en los 16 aminoácidos restantes, al parecer no relacionados con la actividad de la hormona.

La ACTH estimula la liberación de hormonas de la corteza adrenal. Promueve la activación de enzimas que participan en la síntesis de corticoides. Sus efectos se ejercen preferentemente sobre las células de la zona fascicular, principales productoras de glucocorticoides. Si bien la acción principal recae sobre la síntesis y secreción de glucocorticoides (cortisol), también hay aumento de otros corticoides, entre ellos mineralocorticoides (aldosterona) y androgénicos.

La corticotrofina no sólo aumenta la producción de esteroides, sino también la síntesis de proteínas en la glándula adrenal y contribuye a mantener su estructura. Entre las proteínas cuya síntesis es estimulada por ACTH se encuentra StAR (de *steroidogenic acute regulatory*).

En sangre, ACTH varía entre concentraciones de 9 a 52 pg por mL (2 a 11 pmol/L) con los valores máximos en horas de la mañana (7 a 9 horas), que van disminuyendo a lo largo del día para alcanzar los mínimos a la noche.

La secreción es mediada, a través de influencias neurales, por un conjunto de hormonas, principalmente la liberadora de corticotrofina (CRH). También la estimulan la vasopresina e interleuquina 1 (IL-1), catecolaminas, angiotensina II, serotonina. Factores estresantes como traumas, cirugía, hipoxia, hipoglucemia aguda, exposición al frío, etc., aumentan la producción de ACTH. Niveles elevados de corticoides, especialmente de cortisol, la inhiben por retroalimentación.

La acción primaria de ACTH se ejerce a partir de su unión a receptores de membrana acoplados a proteína G_s, activación de adenilato ciclasa y aumento de AMP cíclico.

Alteraciones de la secreción. *Niveles elevados* de ACTH se observan en la enfermedad de Addison, en la cual hay deficiencia en la producción de cortisol en la corteza suprarrenal y en consecuencia falta la inhibición por *feedback*. También hay aumento de la hormona en tumores funcionantes de hipófisis. *Niveles reducidos* en tumores de suprarrenales con secreción incrementada de cortisol.

Hormona tiroestimulante (TSH)

Es una glicoproteína de 28 kDa, con 10 a 15% de la molécula representada por hidratos de carbono. Posee estructura similar a la de gonadotrofinas, compuesta por dos cadenas polipeptídicas denominadas α y β. En una misma especie, la subunidad α es idéntica para TSH y gonadotrofinas. La especificidad reside en la cadena β. Las unidades aisladas carecen de actividad; sólo el dímero $\alpha\beta$ ejerce acción hormonal. La secuencia de la subunidad β ha sido conservada en alto grado en mamíferos.

La subunidad β se une a receptores de alta afinidad en tiroides y estimula la captación de yodo, y la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas (T_3 y T_4). También promueve la síntesis de ARNm y proteínas, lo que resulta en aumento de tamaño y de la vascularización de la glándula. Estas acciones son mediadas por activación de adenilato ciclasa y aumento del nivel de AMP cíclico en tiroides.

La secreción es estimulada por TRH del hipotálamo y modulada por la concentración de T_3 y T_4 en plasma.

Gonadotrofinas

Estas hormonas, producidas por las células gonadotropas del lóbulo anterior, actúan sobre la maduración y funcionamiento de ovario y testículo. Se distinguen la *hormona foliculoestimulante* (FSH) y la *luteinizante* (LH), glicoproteínas las dos. La FSH, de alrededor de 34 kDa, posee un 10% de hidratos de carbono y la LH, de aproximadamente 25 kDa, un 15%. Las cadenas de carbohidratos de ambas gonadotrofinas poseen manosa, galactosa, fucosa, glucosamina, galactosamina y ácido siálico.

Están constituidas por dos unidades polipeptídicas diferentes, las cadenas α y β. La subunidad α es idéntica para las dos hormonas y para tirotrofina de una misma especie; la cadena β es específica para cada una. Si bien la actividad depende de la cadena β, es indispensable la presencia de las dos subunidades para que la hormona demuestre acción biológica.

Acciones de FSH. Induce maduración y desarrollo del folículo de Graaf en ovario. En concierto con la LH, estimula la síntesis de estróge-

nos y progesterona en ovario. Los niveles más altos de FSH en plasma se alcanzan antes de la ovulación.

En testículo, FSH promueve el desarrollo de túbulos seminíferos y es uno de los factores involucrados en la iniciación de la espermatogénesis. Actúa sobre células de Sertoli para estimular la producción de estrógenos a partir de andrógenos y, junto con testosterona, induce en esas células la síntesis de la proteína de unión a andrógenos, que contribuye a mantener altos niveles locales de esas hormonas, nececesarias para sostener la maduración de las células gametogénicas. En el hombre sus niveles en plasma se mantienen constantes.

Acciones de LH. La hormona luteinizante controla en la hembra el desarrollo del cuerpo lúteo y promueve la secreción de estrógenos y progesterona. Induce la síntesis de la proteína StAR (de *steroideogenic acute regulatory*) y la síntesis de enzimas que intervienen en la síntesis de pregnenolona y otros precursores de hormonas esteroides. Si bien el desarrollo del folículo de Graaf está principalmente bajo control de FSH, la producción de estrógenos en el mismo depende de ambas corticotrofinas.

En el macho, la LH es también llamada *estimulante de células intersticiales* (ICSH) o de Leydig. Promueve la producción y secreción de testosterona, que a su vez contribuye a mantener la espermatogénesis y el desarrollo de los órganos sexuales secundarios.

FSH y LH activan la adenilato ciclasa en sus células diana.

Los niveles de LH y FSH varían con la edad; son bajos antes de la pubertad y elevados en mujeres posmenopáusicas. El aumento de LH en varones y la secreción cíclica de FSH en niñas preceden el comienzo de la pubertad.

LH y FSH varían durante el ciclo menstrual. En la fase inicial del ciclo, la LH aumenta lentamente y tiene un incremento marcado a mediados del mismo, lo que desencadena la ovulación. La FSH aumenta ligeramente al comienzo, luego disminuye hasta la mitad del ciclo, momento en el que se produce un aumento paralelo al de LH. Las concentraciones de ambas hormonas caen después de la ovulación.

La secreción de gonadotrofinas es controlada por la hormona liberadora (GnRH); a su vez los esteroides sexuales circulantes influyen sobre la secreción de GnRH por retroalimentación.

Otros factores paracrinos, como activina y folículo estatina, tienen efectos opuestos sobre las células gonadotrofas. La leptina, secretada por adipocitos, tiene acción inhibitoria.

Hormona lactogénica o prolactina (PRL)

Es una proteína de 199 aminoácidos y masa aproximada a 23 kDa. Junto con la hormona de crecimiento (GH) y el lactógeno placentario, forman una familia de proteínas con gran similitud estructural. Las tres han derivado de un mismo gen ancestral, que por duplicaciones y posterior evolución divergente dio lugar a los genes que codifican para esas hormonas. Las semejanzas de estructura determinan que estas hormonas den reacciones inmunológicas cruzadas.

La hormona es secretada predominantemente por células lactotrofas en la adenohipófisis, pero también es expresada y secretada en cerebro, hipotálamo, placenta, amnios y otros.

Los niveles basales de PRL en adultos son muy variables, con un promedio de 13 ng por mL (0,6 nmol/L) en mujeres y 5 ng por mL (0,23 nmol/L) en varones.

Los receptores de prolactina son proteínas formadas por una cadena polipeptídica con un segmento transmembrana. Pertenecen a la superfamilia de receptores de citoquinas. La unión de la hormona al receptor promueve su dimerización. El dominio citoplásmico del receptor se asocia a una proteína-tirosina quinasa Janus (JAK-2) y la activa. La quinasa se autofosforila y también agrega fosfatos a restos tirosina del propio receptor, que entonces atrae dominios SH2 de proteínas citosólicas transductoras de señales y activadoras de transcripción (STAT), que son también activadas por fosforilación (fig. 24-18).

Las proteínas STAT activas se dimerizan, pasan al núcleo y allí se unen a secuencias específicas del ADN a nivel del promotor de determinados genes, por ejemplo los de β-lactoglobulina y β-caseína, e inducen su transcripción (las proteínas codificadas por los genes mencionados son componentes de la leche).

La vía JAK-STAT es utilizada por la prolactina y también por la hormona de crecimiento, factor de crecimiento epidermal, eritropoyetina y muchas citoquinas.

Juntamente con LH, la prolactina promueve la formación del cuerpo lúteo y la producción de progesterona. Su función mejor caracterizada es la de estimular el crecimiento lobuloalveolar en la glándula mamaria durante el embarazo y la lactogénesis posparto. La prolactina es el principal factor promotor del desarrollo de los ductos y la proliferación alveolar. Si bien los estrógenos y la progesterona coadyuvan en esas acciones, tienen efecto depresor de la acción de PRL sobre la lactogénesis. La disminución de esas hormonas

después del parto permite la iniciación de la lactancia. La prolactina es el factor principal.

La PRL también activa la función inmunitaria por estímulo de la proliferación de linfocitos.

La secreción de prolactina aumenta durante el embarazo y disminuye rápidamente a las 8 a 10 semanas después del parto. Altas concentraciones de PRL inhiben la secreción de hormonas liberadoras de gonadotrofinas, luteinizante y folículo estimulante, lo cual reduce la fertilidad y las posibilidades de que la mujer lactante quede embarazada.

Hormona de crecimiento (GH) o somatotrofina

La hormona de crecimiento (GH, del inglés *growth hormone*) es sintetizada como prohormona en las células somatotrofas de hipófisis anterior. Antes de ser secretada se elimina un péptido de 26 aminoácidos del extremo N-terminal. La GH "madura" es una proteína simple de 21,5 kDa, compuesta por 191 aminoácidos. Está formada por una sola cadena, que presenta dos puentes disulfuro. Existen homologías estructurales entre somatotrofina, prolactina y lactógeno placentario, proteínas derivadas de un gen ancestral común.

La capacidad funcional de la hormona de crecimiento reside en una porción relativamente pequeña de la molécula, ya que la hidrólisis parcial con quimotripsina no anula su actividad.

Si bien hay grandes semejanzas entre somatotrofinas de distintas especies, existe un alto grado de especificidad. Por ejemplo, las hormonas bovina y porcina no poseen actividad en el hombre, en el cual sólo la hormona humana y la de algunos primates provocan respuesta.

La secreción de GH está bajo control de un conjunto de factores neurales, metabólicos y hormonales. De éstos los más importantes son la hormona liberadora de somatotrofina (GHRH) que la estimula y la somatostatina, que la inhibe. A éstos se agrega *ghrelin*, una proteína de 218 aminoácidos sintetizada en varios tejidos, especialmente mucosa gástrica y también en hipotálamo. Estimula la liberación de GH, induce la ingestión de alimento y favorece el desarrollo de obesidad.

En el plasma sanguíneo la mayor parte de la GH se transporta en unión con una proteína específica. Tiene una vida media de 20 a 50 minutos y su concentración en adultos a primera hora de la mañana es menor de 2 ng por mL (90 pmol/L).

La somatotrofina es una hormona multifuncional; promueve el crecimiento posnatal de tejidos esqueléticos y blandos por acciones directas e indirectas. Los efectos indirectos son mediados por los *factores de crecimiento similares a insulina* (IGF).

La acción principal de la somatotrofina es estimular la proliferación y maduración celular en muchos tejidos, especialmente hueso, cartílago y músculo. Desarrolla funciones metabólicas muy generales:

Proteínas y ácidos nucleicos. La hormona de crecimiento estimula el anabolismo de proteínas. Incrementa el ingreso de aminoácidos en las células por activación de los sistemas de transporte, especialmente en músculo e hígado. Aumenta la actividad de ADN y ARN polimerasas, acelerando la transcripción y traducción de ARNm. Disminuye el catabolismo proteico; como consecuencia de la activación de la utilización de grasas de depósito, contribuye a reducir el consumo de proteínas con fines energéticos.

Lípidos. La GH disminuye la lipogénesis. Ejerce acción lipolítica, con aumento de ácidos grasos libres en sangre. Esta estimulación de la movilización de ácidos grasos se acompaña de incremento de su degradación y conversión en acetil-CoA.

Carbohidratos. La hormona de crecimiento disminuye la utilización de glucosa. En el músculo, la somatotrofina deprime el transporte de glucosa y la actividad glucolítica, acciones opuestas a las de insulina. En el hígado produce aumento de la gluconeogénesis a partir de aminoácidos, acción que secundariamente contribuye a aumentar la glucogenogénesis. La disminución de la utilizacion periférica de glucosa y la activación de la gluconeogénesis tienden a elevar los niveles de glucosa circulante. La GH se comporta como hiperglucemiante (diabetógena) y es el mayor determinante de resistencia a la insulina.

La hormona de crecimiento también es secretada en otros órganos como gonadas, placenta y glándula mamaria y en sistema nervioso, en los que actuaría en forma autocrina o paracrina. En gonadas, GH está relacionada con procesos de diferenciación sexual, maduración puberal, esteroidogénesis, gametogénesis y ovulación. En sistema nervioso, con el crecimiento, proliferación, diferenciación y supervivencia celular, y además participa en funciones cognitivas y de conducta.

La Tabla 26-1 resume las acciones metabólicas de la hormona de crecimiento. Estas acciones no alcanzan para explicar los efectos promotores del crecimiento de la somatotrofina.

Tabla 26-1. Acciones metabólicas de la hormona de crecimiento.

↑ Síntesis de ADN, ARN y proteínas
↑ Retención de nitrógeno y fósforo
↓ Aminoácidos libres y urea en sangre
↑ Lipólisis
↑ Ácidos grasos libres en plasma
↓ Glucólisis
↑ Gluconeogénesis
↑ Glucemia
↑ Somatomedinas
↑ Secreción de insulina
↑ Incorporación de sulfato a cartílago

Parte de esas funciones podrían deberse a agentes mediadores producidos en diversos tejidos bajo el influjo de la hormona de crecimiento. El descubrimiento de un *factor de sulfatación*, responsable de la incorporación de sulfato en la molécula de condroitinsulfato en cartílago, llevó a proponer la existencia de tales intermediarios, a los cuales se los denominó *somatomedinas*, también llamados *factores de crecimiento semejantes a insulina* (IGF, de *insulin-like growth factors*).

Factores de crecimiento semejantes a insulina. Existen dos hormonas de esta familia, IGF-I e IGF-II, sintetizadas en diversos tejidos. IGF-II es la forma principal en el feto; tiene acción sobre el desarrollo *in utero*. IGF-I es activa en todas las etapas del desarrollo, tanto pre- como posnatales. Sin embargo, la deficiencia de GH no afecta significativamente el crecimiento prenatal, lo que indica que la IGF-I comienza a ser regulada por GH después del nacimiento.

Las dos somatomedinas tienen similitud estructural con la insulina (IGF-I tiene 42% de homología con proinsulina), lo cual apoya la idea de un gen ancestral común para las tres moléculas.

La IGF-I se caracteriza por: a) su concentración en plasma sanguíneo es regulada por GH, b) estimula la incorporación de sulfato y glucosamina a proteoglicanos de cartílago, c) aumenta la actividad mitótica de fibroblastos, d) remeda la acción de insulina en músculo y tejido adiposo, e) activa, a través de la vía de fosforilación PI3K-AKT, las vías de TORC1 y TORC2.

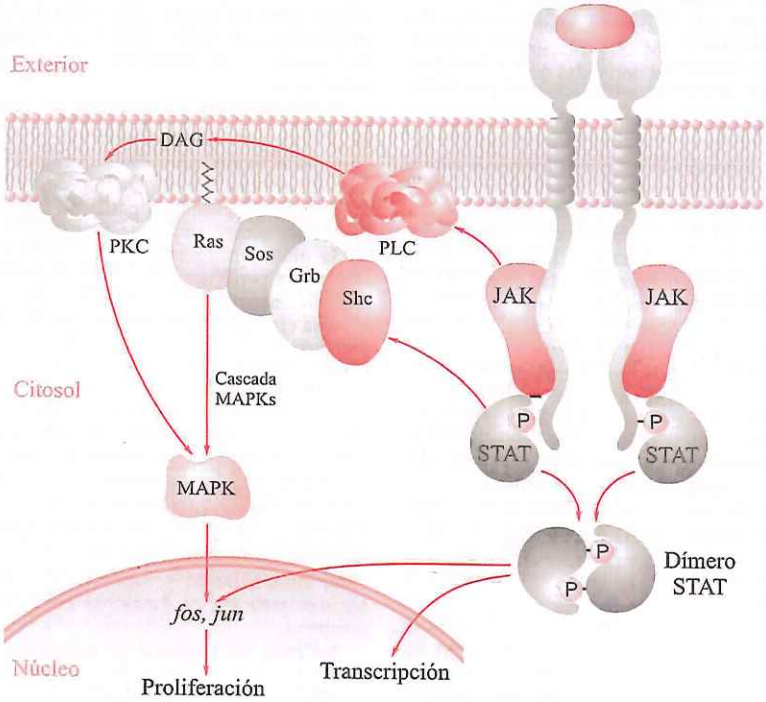


Fig. 26-4. Vías de transmisión de señales activadas por la hormona de crecimiento.

El principal órgano de producción de somatomedinas es el hígado; también se las ha encontrado en riñón y en cultivo de fibroblastos de pulmón tratados con GH.

En la desnutrición proteica disminuye la actividad plasmática de IGF. Este efecto es posiblemente debido a la presencia de inhibidores de somatomedinas, que limitan el crecimiento cuando la nutrición es deficiente. Los glucocorticoides y estrógenos aumentan la producción de esos inhibidores.

Mecanismo de acción de la hormona de crecimiento. Las múltiples acciones de la hormona se inician con la unión a receptores de membrana plasmática en las células blanco. El receptor de GH pertenece a la superfamilia que comprende también a los de prolactina, factor de crecimiento epidermal y numerosas citoquinas. Existen dos formas de este receptor; uno es una proteína integral de membrana y el otro es soluble, de molécula más corta, con secuencia idéntica a la del segmento extracelular del receptor de membrana.

La fijación de la hormona al receptor produce dimerización y asociación de sus dominios citosólicos a tirosina quinasa JAK-2, que al activarse se fosforila e inicia una cascada de fosforilaciones. Las acciones de la GH sobre la transcripción de genes son mediadas por proteínas STAT, que activan genes de respuesta temprana, como *c-fos* y *c-jun*, inhibidor de serina proteasa (*Spi 2.1*) y otros. La vía JAK-STAT es la principal por la cual la GH influye sobre la actividad de transcripción de genes, pero no es la única (fig. 26-4). GH también es capaz de activar proteína quinasas de la cascada de MAP, y de inducir la activación de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K). En algunas acciones de GH está implicada la proteína quinasa C. Entre las proteínas cuya síntesis es activada por GH se cuenta la IGF-I.

Las somatomedinas o IGF, mediadores de la acción de GH, tienen sus propios receptores que son heterotetrámeros semejantes a los receptores de insulina (fig. 25-7 B). Poseen el sitio catalítico de proteína-tirosina quinasa en su dominio citosólico. Al ser activados por unión de IGF inician una cascada de fosforilaciones que determina estimulación de la transcripción. Entre las proteínas fosforiladas en una vía activada por IGF se cuentan los *sustratos del receptor de insulina* (IRS).

Condiciones patológicas relacionadas con la hormona de crecimiento

Exceso de hormona. La hiperactividad de la glándula durante la niñez y adolescencia, es decir, antes del cierre de las epífisis, resulta en *gigantismo*. Los huesos largos aumentan de longitud, de modo que los pacientes alcanzan gran estatura.

La *acromegalia* es producida por hiperfunción hipofisaria después del cierre de las epífisis, cuando el crecimiento ha cesado. Los pacientes presentan cambios faciales característicos, debidos a engrosamiento de los huesos, cartílagos y tegumentos de la cara; hay también aumento en el tamaño de manos, pies y vísceras.

El exceso de hormona de crecimiento bloquea la acción de la insulina; entre otros efectos, inhibe el transporte de glucosa en músculo y tejido adiposo. Los pacientes presentan alteración en la prueba de tolerancia a la glucosa.

Deficiencia. Se observa en varias condiciones hereditarias que determinan fallas en la producción de somatotrofina. La incapacidad congénita para sintetizar GH produce alteraciones serias en el crecimiento, que configuran el llamado *enanismo hipofisario*. En estos casos hay reducción proporcionada de las dimensiones corporales; no se afecta el desarrollo intelectual.

Como las hormonas de crecimiento de otras especies son inactivas en humanos, estos pacientes sólo pueden ser tratados con somatotrofina aislada de hipófisis humana. Esto representaba en el pasado una seria limitación en el tratamiento de pacientes con deficiencia de GH. La ingeniería genética permite actualmente la obtención de hormona a partir de cultivos de bacterias a las cuales se les ha introducido información para sintetizarla, lo cual resuelve el problema de abastecimiento de somatotrofina humana con fines terapéuticos.

A veces la deficiencia abarca a otras hormonas hipofisarias además de GH (panhipopituitarismo). En este tipo de problemas se incluye un cuadro debido a mutaciones en el gen que codifica un factor de transcripción llamado *Pit-1*. El factor Pit-1 es requerido para la transcripción de varios genes de hormonas hipofisarias y para el desarrollo de células somatotrofas, tirotrofas y lactotrofas.

Existe otra condición clínica llamada *enanismo de Laron* en el cual los niveles de GH en sangre son normales o elevados. El tratamiento con hormona no produce efecto alguno. Estos pacientes son resistentes a la GH debido a un defecto congénito que impide la síntesis o expresión de receptores de somatotrofina. Estos pacientes no producen IGF en respuesta a la hormona de crecimiento.

Los pigmeos africanos son otro ejemplo de alteración del crecimiento debida a defectos parciales en el receptor de GH. En ellos la administración de la hormona no promueve aumento de IGF-I. En cambio, hay producción de IGF-II.

PLACENTA

La placenta, órgano que se desarrolla durante el embarazo, produce principios tróficos cuyas acciones semejan las de algunas hormonas de adenohipófisis.

Gonadotrofina coriónica (HCG)

Producida en la placenta, aparece en plasma y orina de embarazadas. Su presencia en orina es el índice utilizado en pruebas diagnósticas de embarazo.

Es una glicoproteína con propiedades biológicas e inmunológicas semejantes a las de LH hipofisaria. Está constituida por dos subunidades (α y β). La cadena α es casi idéntica a la de moléculas de LH, FSH y TSH.

Lactógeno placentario

Tiene semejanzas fisicoquímicas e inmunológicas con hormona de crecimiento y prolactina.

Posee múltiples actividades; entre las principales, las acciones somatotróficas (estimula el crecimiento), mamotróficas (promueve el desarrollo de alvéolos mamarios y la producción de leche), luteotrófica y eritropoyética. Entre sus acciones metabólicas se cuentan: a) estimulación de la lipólisis, con aumento de la concentración de ácidos grasos circulantes; b) inhibición de la utilización de glucosa, lo cual produce hiperglucemia; c) aumento de N total en plasma. Estos cambios metabólicos asegurarían una buena provisión de glucosa, ácidos grasos y aminoácidos al feto.

Actúa por activación de adenilato ciclasa y aumento de AMP cíclico.

NEUROHIPÓFISIS

De la neurohipófisis pueden extraerse dos sustancias activas bien caracterizadas, la *arginina-vasopresina*, de acción antidiurética y presora, y la *oxitocina*, estimulante de músculo liso de glándula mamaria y útero.

Vasopresina y oxitocina son sintetizadas como preprohormonas en las neuronas secretorias de los núcleos supraópticos y paraventriculares del hipotálamo. El péptido señal es separado cuando ingresa al retículo endoplásmico y se forman prohormonas; la prooxitocina comprende a la hormona y a un trozo adicional de unos 10 kDa llamado *neurofisina I;* en la provasopresina la hormona está asociada a *neurofisina II*, también de 10 kDa. Las prohormonas son englobadas como gránulos secretorios en vesículas y transportadas, a lo largo de los cilindroejes, desde el cuerpo celular hasta las terminaciones nerviosas en la neurohipófisis. Dentro de la vesícula se produce hidrólisis que deja libre las hormonas y neurofisinas. La secreción del contenido vesicular hacia la circulación se produce por exocitosis. Aún no se conoce si las neurofisinas cumplen alguna función, además de formar parte de las prohormonas.

Oxitocina

Es un nonapéptido cíclico de masa molecular de alrededor de 1.000 Da. Los primeros seis aminoácidos (cisteína, tirosina, isoleucina, glutamina, asparragina y cisteína) forman un ciclo cerrado por un puente disulfuro entre las dos cisteínas. Desde la última cisteína se desprende una cadena de tres aminoácidos, constituida por prolina, leucina y glicinamida (fig. 26-5).

La oxitocina circula libre en la sangre; es rápidamente degradada, principalmente en hígado y riñón. Su vida media es de 3 a 5 minutos.

La oxitocina también es sintetizada en útero, placenta, amnios, cuerpo lúteo, testículos y corazón.

El receptor de oxitocina se acopla a proteína Gq que activa PLC.

Acciones. Estimula la contracción del útero; su efecto sobre el músculo liso uterino es condicionado por la presencia de estrógenos y progesterona. Los estrógenos acentúan el efecto contráctil, mientras la progesterona lo inhibe. Hacia el final del embarazo se produce una reducción notable de los niveles de progesterona y aumenta la sensibilidad a la oxitocina. La hormona no aumenta en sangre hasta que el trabajo de parto ha comenzado. En ese momento, la liberación de oxitocina contribuye decididamente a facilitarlo. Si bien se cree que normalmente la oxitocina no es el factor que inicia las contracciones, su administración farmacológica favorece la inducción del parto.

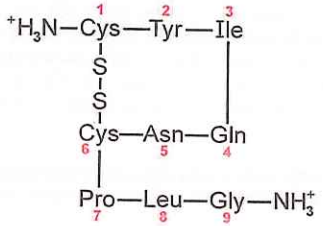


Fig. 26-5. Oxitocina.

En la glándula mamaria, la oxitocina produce excreción de leche por contracción del músculo liso (mioepitelio). La secreción de oxitocina es activada por la succión del pezón. A diferencia de PRL, la respuesta a la oxitocina no declina hasta los 6 meses posparto siempre que la lactancia continúe. La hormona no tiene acción sobre el proceso de formación de leche.

La hormona cumple otras funciones relacionadas con la reproducción, como luteinización del folículo y la esteroidogénesis en ovario. En el hombre estimula la erección espontánea.

Arginina-vasopresina

También llamada *hormona antidiurética* (ADH), es un nonapéptido que difiere de la oxitocina en sólo dos aminoácidos: la isoleucina en posición 3 de la oxitocina es reemplazada por fenilalanina en la hormona antidiurética y la leucina en posición 8 es sustituida por arginina (fig. 26-6).

La ADH circula libre en sangre; su vida media es de unos 15 minutos.

Acciones. La acción principal de la hormona antidiurética es controlar la reabsorción facultativa de agua en los túbulos distales del nefrón. Aumenta la permeabilidad al agua de la superficie luminal de tubos y ductos colectores. También disminuye la filtración glomerular, lo que contribuye a reducir la diuresis. La ADH, en conjunto con osmo- y baroreceptores, mantiene el volumen hídrico en el organismo.

La ADH se une a receptores de membrana llamados V_2, acoplados a proteína G_s, en células de túbulos contorneados distales y tubos colectores medulares. Induce activación de adenilato ciclasa, aumento en la concentración de AMPc y estimulación de proteína quinasa A, que inicia una cascada de fosforilaciones. El resultado es el traslado de canales de agua (acuaporina 2, AQP 2) (pág. 211) desde vesículas en el interior de la célula hacia la membrana luminal. Esto determina un notable incremento de la reabsorción de agua de la luz tubular, aumenta la osmolaridad y disminución del volumen de la orina excretada.

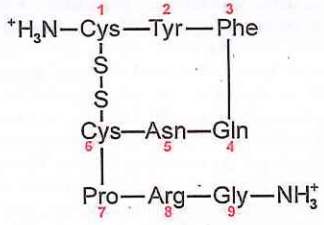


Fig. 26-6. Hormona antidiurética o vasopresina.

Además de su acción antidiurética, la ADH o vasopresina tiene potente acción vasopresora, con aumento de la resistencia periférica total. Este efecto es el resultado de la unión de la hormona a receptores V_1, acoplados a proteína G_q, en el músculo liso vascular. Se activa fosfolipasa C, que libera los segundos mensajeros inositoltrisfosfato y diacilglicerol. La respuesta final es la contracción del músculo liso.

Otras acciones que la vasopresina cumple a través de los receptores V_1 son la estimulación de la síntesis de prostaglandinas y la activación de la glucogenólisis en hígado.

Existe un tercer tipo de receptores a los cuales se une la ADH; son los V_3, asociados a proteínas G_q y localizados en la hipófisis. Actuando sobre éstos, la hormona potencia la acción de CRH y contribuye a la liberación de ACTH.

Cuadros clínicos relacionados con ADH. La falta de secreción de vasopresina produce una enfermedad denominada *diabetes insípida*, caracterizada por exagerada diuresis; los pacientes eliminan 15 a 20 litros por día de orina de baja osmolaridad.

Tumores (por ej.: craneofaringioma) y otras alteraciones del hipotálamo (secundarias a cirugía de tumores hipotalámicos o hipofisiarios) que causan hipopituitarismo pueden producir diabetes insípida. Hay defectos hereditarios recesivos y dominantes, muy raros, que se manifiestan ya en la infancia y otra forma idiopática que se presenta en la adolescencia o adultez.

Se han descripto cuadros con la misma sintomatología, en los cuales la producción de ADH y los niveles de la hormona en sangre son normales o incluso aumentados. Es la llamada *diabetes insípida nefrogénica*. Puede observarse en enfermedades renales crónicas, particularmente las que afectan la médula renal y los tubos colectores. Existen formas hereditarias de diabetes insípida nefrogénica, muy raras, asociada a defectos en el gen que codifica al receptor V_2. Otra forma se debe a mutaciones en el gen de la acuaporina 2. En ambos casos hay incapacidad para responder a la ADH.

Existe un *síndrome de secreción inapropiada de ADH* en el cual está alterado el mecanismo de regulación de la secreción de la hormona. Se da en pacientes con cáncer de pulmón, tuberculosis pulmonar, traumas graves y otras condiciones en las cuales se pierde el control por retroalimentación y se secretan cantidades exageradas de ADH.

TIROIDES

La glándula tiroides contiene folículos formados por células epiteliales (células foliculares) en cuyo interior se encuentra un material viscoso (coloide) con la glicoproteína *tiroglobulina*, que incluye en su estructura las hormonas sintetizadas en la glándula.

Las hormonas tiroideas son *tiroxina* (3,5,3',5'-tetrayodotironina o T_4) y *3,5,3'-triyodotironina* (T_3)[1]. Ambas son aminoácidos yodados, derivados de la tirosina. Su estructura básica es la tironina, constituida por unión de dos anillos fenólicos. Uno de los anillos posee una cadena alanina (fig. 26-7).

En la tiroxina, corrientemente designada con la abreviatura T_4, a dicha estructura básica se agregan cuatro átomos de yodo en las posiciones 3,5,3' y 5'. La T_3 posee yodo en las posiciones 3,5 y 3', es ocho veces más activa que la tiroxina (T_4) y su acción se hace evidente mucho más rápidamente. En diferentes tejidos se ha encontrado 3,3',5'-triyodotironina, también llamada *T_3 invertida* o *reversa* (T_{3r}), carente de actividad. La presencia de yodo en las posiciones 3 y 5 es indispensable para la actividad del producto.

Biosíntesis de hormona tiroidea

El yodo es constituyente esencial de la molécula de las hormonas tiroideas. Para sintetizarlas, la glándula utiliza el yodo provisto por los alimentos, principalmente en forma de yoduros inorgánicos. La ingesta de yoduros debe ser de 100 μg por día para asegurar el normal funcionamiento de la tiroides.

Absorción y distribución de yoduros. Los yoduros de los alimentos son rápidamente absorbidos en duodeno y se transportan por la sangre unidos a proteínas plasmáticas; la concentración de I en los líquidos extracelulares es de 1,0 a 1,5 μg por dL. Aproximadamente dos tercios del yoduro absorbido se excretan por riñón. El tercio restante es captado por la tiroides. Cantidades muy pequeñas se secretan por glándulas salivales e intestino.

Captación de yoduros. Se realiza aun contra el gradiente de concentración; requiere energía. El transporte de yoduro a través de la membrana basal de la célula tiroidea es efectuado por un cotransportador Na^+/I^- (*symporter*); es un proceso activo secundario, dependiente de la actividad de

[1] En la glándula tiroides se produce también *calcitonina*, hormona relacionada con la homeostasis del calcio, considerada en otra sección de este capítulo.

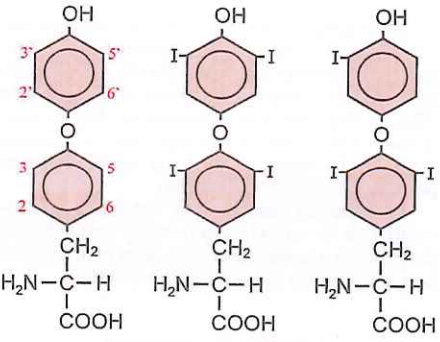


Fig. 26-7. Tironina y hormonas tiroideas (T_4 y T_3).

la Na^+,K^+-ATPasa; la inhibición de ésta por ouabaína deprime el ingreso de yodo a la tiroides. Aniones como pertecnato (TcO_4^-), perclorato (ClO_4^-) y tiocianato (SCN^-) actúan como inhibidores competitivos del transporte de yodo.

La capacidad de la tiroides para "atrapar" yoduro es notable; la concentración en la glándula es 30 a 40 veces mayor que en el plasma. El proceso puede explorarse mediante el uso de yodo radiactivo (^{125}I o ^{131}I).

Los yoduros pasan desde la célula a la luz del folículo (hacia el coloide) por un segundo transportador (intercambiador I^-/Cl^-) de la membrana apical, llamado *pendrin*.

Oxidación de yoduros. En la interfase célula-coloide, el yoduro (I^-) es oxidado (activado) en reacción catalizada por *peroxidasa tiroidea*, hemoproteína que utiliza peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como fuente de oxígeno. La enzima se encuentra fijada a la membrana apical de la célula folicular, próxima al lumen. El H_2O_2 probablemente es generado por una oxidasa dependiente de NADPH.

Apotiroglobulina. Es una glicoproteína de 660 kDa, con 10% de hidratos de carbono. Posee restos tirosina ubicados en posiciones accesibles para su yodación. La proteína es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso de células tiroideas; en el aparato de Golgi recibe el agregado de hidratos de carbono. La apotiroglobulina es secretada hacia el lumen del folículo por exocitosis.

Organificación del yodo. Este proceso también es catalizado por la *peroxidasa tiroidea*. El yodo activo es unido primero en posición 3 del anillo fenólico de restos tirosina de la apotiroglobulina, para formar 3-monoyodotirosinil (MIT). Luego se agrega un

segundo yodo en posición 5 y se forma 3,5-diyodotirosinil (DIT). Nótese que el yodo no se fija a tirosina libre, sino a restos tirosinilo integrantes de la cadena polipeptídica de apotiroglobulina. El paso siguiente es el acoplamiento del grupo fenólico de DIT o de MIT sobre un DIT en la cadena para formar T_4 o T_3 respectivamente, que quedan incluidas como restos aminoacídicos de la proteína (fig. 26-8). El acoplamiento produce un intermediario quinoléter que luego da yodotironina. El resto alanil

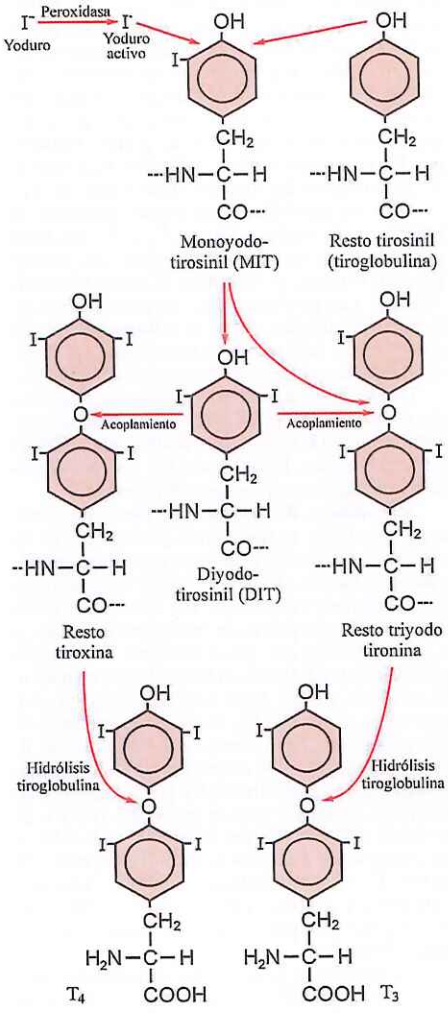


Fig. 26-8. Biosíntesis de hormonas tiroideas.

del tirosinil donante al separarse el resto fenólico queda en la cadena de la tiroglobulina como dehidroalanina. Algunas de las tirosinas yodadas en la cadena de apotiroglobulina se encuentran próximas, lo cual facilita la cesión del resto fenólico yodado de un DIT a otro. Después de la yodación, la apotiroglobulina se convierte en tiroglobulina, con restos T_4, T_3, DIT y MIT como constituyentes de su estructura; hay unas diez veces más T_4 que T_3. La tiroglobulina es almacenada en los folículos, integrando la sustancia coloide.

Secreción de T_3 y T_4. Los estímulos que determinan la liberación de hormonas tiroideas (TSH entre otros) inician la movilización de la tiroglobulina contenida en el coloide. La zona luminal de la célula tiroidea emite seudópodos que engloban gotitas de coloide y las internan por pinocitosis. Se produce luego fusión de las vesículas con lisosomas para formar lisosomas secundarios, en los cuales se produce hidrólisis de la tiroglobulina. Quedan en libertad los aminoácidos componentes, entre ellos tiroxina (T_4), 3,5,3'-triyodotironina (T_3), DIT y MIT. DIT y MIT no tienen actividad biológica; si escaparan de la célula, se perdería una cantidad importante de yodo. Esto no sucede gracias a la presencia de *desyodasas* (existen tres tipos con diferente distribución celular), proteínas con selenio que separan el yodo de las moléculas de MIT y DIT libres y permiten su reutilización para la síntesis de hormona tiroidea.

T_4 y T_3 libres atraviesan la membrana basolateral de la célula para alcanzar los capilares sanguíneos.

Todas las etapas de la biosíntesis y secreción de hormonas tiroideas son activadas por la hormona tiroestimulante (TSH) de la hipófisis. El nivel de T_3 y T_4 en sangre circulante, a su vez, tiene acción regulatoria, por retroalimentación, sobre la hipófisis.

Sustancias del grupo de las tiocarboamidas, como *propiltiouracilo,* son inhibidoras de la peroxidasa tiroidea; bloquean la oxidación y organificación del I. También actúan en tejidos periféricos, donde inhiben la 5'-monodesyodasa que cataliza la conversión de T_4 en el producto más activo T_3. *Metimazol* y *carbimazol* son otros compuestos antitiroideos; inhiben la oxidación y organificación del yodo, pero no afectan la desyodación periférica.

La administración de yodo en exceso a personas normales puede inhibir la organificación y la síntesis de hormona tiroidea. Este fenómeno, denominado *efecto de Wolff-Chaicoff*, es sólo temporario. Después de varios días, aunque se continúe la ingesta elevada de yoduro, se produce un "escape" del bloqueo.

Transporte en plasma. T_3 y T_4 son transportadas en sangre en asociación con proteínas plasmáticas. Fundamentalmente son dos las proteínas que actúan como transportadores específicos de las hormonas tiroideas. Una es la *globulina fijadora de tiroxina* (TBG, de *thyroxine binding globulin*), glicoproteína de 50 kDa con movilidad electroforética intermedia entre globulinas α_1 y α_2, y otra es prealbúmina fijadora de tiroxina, también llamada *transtirretina* (TTR). La concentración de T_4 en plasma es de 8 μg por dL (100 nmol/L) y la de T_3 unas 50 veces menor, 0,12 μg por dL (0,18 nmol/L). Sólo muy pequeña proporción de ese total se encuentra libre, en equilibrio dinámico con la hormona unida a proteína. La TBG tiene la mayor afinidad; fija del 70 al 75% de T_4 unida a proteína en el plasma; la transtirretina vehiculiza alrededor del 10% de las hormonas tiroideas circulantes; su afinidad por T_3 es unas diez veces mayor que para T_4. Alrededor del 15% de T_4 y T_3 en plasma se fija a albúmina. Esta fracción se disocia rápidamente, razón por la cual constituye una buena fuente de hormona libre para los tejidos.

El 99,4% de T_4 en plasma está unido y sólo 0,04% está libre. Para T_3 la proporción de hormona libre es del 0,4%. La forma libre es rápidamente disponible para ingresar en las células, razón por la cual es importante desde el punto de vista funcional. Los mecanismos homeostáticos regulan la porción de hormona libre y no la total. Los estrógenos estimulan la síntesis de TBG; durante el embarazo los niveles de TBG aumentan y la concentración total de T_4 puede duplicarse sin aumentar significativamente la cantidad de hormona libre. Esto debe tenerse en cuenta para no hacer un diagnóstico incorrecto de hipertiroidismo a partir de mediciones de hormona total en plasma.

La vida media de T_4 en plasma es de unos 7 días, mientras la de T_3 es de un día.

Ingreso a los tejidos periféricos. Aunque son hidrofóbicas, las hormonas tiroideas no atraviesan por difusión libre la membrana plasmática de las células efectoras. Su ingreso es facilitado por transportadores. En las células T_4 pierde el yodo en posición 5' o 5 por acción de 5' o 5 *monodesyodasa* y se convierte en T_3 o en T_{3r} (T_3 reversa o invertida, 3,3',5'-triyodotironina). T_3 es notablemente más activa que T_4; se la considera la verdadera hormona tiroidea, mientras T_4 sería una prohormona. T_{3r} prácticamente no tiene actividad. La proporción en la cual T_4 es convertida en T_3 o en T_{3r} varía de un tejido a otro; aun en un mismo tejido cambia según su estado metabólico. La conversión de T_4 en T_{3r} (inactiva) es proporcionalmente mayor en la vejez, en la desnutrición, en estados febriles, enfermedades crónicas serias, neoplasias diseminadas, quemaduras graves. Al parecer, esto representa un mecanismo compensatorio para reducir la estimulación del catabolismo promovido por las hormonas tiroideas.

Degradación. La principal vía es la desyodación progresiva, iniciada por 5'-monodesyodasa, que forma el compuesto más potente, T_3, o por 5-monodesyodasa, cuyo producto es T_{3r}, inactiva. Ambas desyodasas son selenoenzimas. Las T_3 son convertidas sucesivamente en T_2, T_1 y tironina. Algunos de los productos del metabolismo de hormonas tiroideas, previamente considerados sin actividad, son actualmente reconocidos como "hormonas tiroideas no clásicas", como, por ejemplo, T_2 (3,5-diiodo tironina) que, en mamíferos, actúa en la expresión de genes regulados por T_3; se requieren dosis 100 veces más altas de T_2, para obtener los mismos efectos que con T_3.

Otra vía catabólica ocurre principalmente en hígado; es la conjugación de T_4 y T_3 con ácido glucurónico y, en menor extensión, con sulfato. En ambos casos se esterifica el grupo hidroxilo fenólico. Los productos son excretados por la bilis hacia el intestino. Parte de la hormona tiroidea conjugada es reabsorbida y transportada al riñón, donde puede ser desyodada o excretada intacta.

Una tercera alternativa es la descarboxilación y desaminación de T_4 y T_3 para formar ácido tetrayodotiroacético (*Tetrac*) y triyodotiroacético (*Triac*) respectivamente. Estos productos son considerablemente menos activos que sus precursores.

Mecanismo de acción. Las hormonas tiroideas atraviesan la membrana plasmática de las células por difusión y también por transporte facilitado y llegan al núcleo, donde se encuentran sus receptores específicos. En humanos existen dos tipos de receptores de hormonas tiroideas, α y β, codificados por genes distintos. En cerebro predominan los de tipo α, en hígado los β y en músculo cardíaco ambos están representados en proporciones similares. En el núcleo los receptores se encuentran como homo- o heterodímeros fijados a elementos de respuesta en el ADN. Los heterodímeros están formados por un receptor de hormona tiroidea y uno de retinoides (RXR). El receptor no ocupado por hormona está unido a un correpresor que deprime la transcripción. Al unirse T_3 o T_4 se producen cambios conformacionales que desplazan al correpresor y habilitan al complejo HR para activar la transcripción de genes definidos.

Los receptores de hormonas tiroideas pertenecen a la superfamilia de receptores de esteroides y presentan homología estructural con ellos. La

afinidad del receptor es unas diez veces mayor para T_3 que para T_4. Los efectos sobre la transcripción no son inmediatos, requieren horas o días para alcanzar su máxima expresión.

Acciones. Las acciones de la tiroides son tan generales que prácticamente no hay célula en el organismo libre de su influencia. Dentro de esas acciones pueden mencionarse: a) Activación de la síntesis de ARN mensajero, ribosomal y de transferencia y, como consecuencia, de la síntesis de proteínas. Entre éstas se incluyen numerosas enzimas. b) Acción promotora del crecimiento, en parte dependiente de los efectos mencionados. c) Mayor actividad Na^+,K^+-ATPasa en casi todas las células (excepto en cerebro, bazo y testículos). Este efecto se debe a aumento del número de "bombas de sodio" insertas en la membrana de las células. d) Incremento del consumo de oxígeno en tejidos y promoción de la utilización de glucosa, lípidos y aminoácidos. e) Estimulación de la síntesis de colesterol y aumento de la producción de receptores LDL; con ello se sustrae más colesterol del plasma.

En términos generales, a concentraciones fisiológicas las hormonas tiroideas tienen efecto anabólico. Incrementan la tasa metabólica basal, inducen la síntesis de oxidorreductasas mitocondriales, entre ellas glicerofosfato deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa y citocromooxidasa.

En dosis elevadas, las hormonas tiroideas tienen acción catabólica; se intensifica la proteólisis y el balance nitrogenado se torna negativo. Aumenta la degradación de carbohidratos y lípidos.

Ejercen un efecto aparentemente desacoplante de las fosforilaciones, con mayor consumo de oxígeno y producción de calor; reducen la formación de ATP y la relación P/O.

Disminuyen la actividad de superóxido dismutasa, lo que resulta en posible aumento de radicales anión superóxido. Esto puede contribuir a los efectos deletéreos del hipertiroidismo.

Se ha propuesto que la acción termogénica se debe al aumento de la actividad de Na^+,K^+-ATPasa en las membranas, con el consiguiente incremento del gasto de energía en células en reposo. También puede contribuir a la liberación de calor el aumento del número de receptores β-adrenérgicos y el funcionamiento de ciclos fútiles. Las hormonas tiroideas con frecuencia activan algunas vías metabólicas simultáneamente en ambos sentidos, anabólico y catabólico.

Acciones en músculo. Aumentan el contenido de Na^+,K^+-ATPasa en la membrana y la actividad ATPasa de miosina. Estimulan la actividad de Ca^{2+}-ATPasa y el ingreso de Ca^{2+} en retículo sarcoplásmico, ampliando la cantidad disponible de este catión. Sobre músculo cardíaco tiene efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos. Aumenta el tono diastólico y el número de receptores β-adrenérgicos.

Acciones sobre tejido adiposo. T_3 y T_4 tienen un importante papel en el desarrollo y funcionamiento de los tejidos adiposos blanco y pardo. Pueden inducir diferenciación de los adipocitos.

Acciones sobre hueso. Las hormonas tiroideas aumentan la resorción y, en menor grado, la nueva formación de hueso.

Acciones sobre sistema nervioso. T_3 y T_4 son indispensables durante un período crítico que va desde el sexto mes de gestación hasta los dos años de vida para el desarrollo fetal y neonatal del cerebro. Regulan la diferenciación neuronal, la mielinogénesis, el crecimiento neuronal y formación de sinapsis.

Debido al alto contenido de 5-desyodasa en placenta, se desactivan T_4 y T_3 que llegan con la sangre materna y se reduce marcadamente la cantidad de hormonas tiroideas en la circulación fetal. En las primeras semanas de gestación no se afecta significativamente el desarrollo, pero después de la undécima semana el feto es totalmente dependiente de la secreción de su propia tiroides. En ausencia de hormona tiroidea hay reducción del crecimiento y aún más del desarrollo de cerebro y músculo esquelético, que resulta en *cretinismo* (retardo mental y enanismo).

Acciones no genómicas. Si bien las principales acciones de T_3 y T_4 son mediadas por receptores nucleares y se ejercen sobre los elementos de respuesta de sus genes "blanco", se han descrito efectos que, a diferencia de los genómicos, son evidentes en segundos o minutos. Se utilizarían otros receptores y se activarían sistemas de señales todavía no bien identificados. Ejemplos de estas acciones son: aumento del transporte de glucosa y aminoácidos, activación de Ca^{2+}-ATPasa de membrana plasmática y de retículo sarco- y endoplásmico (SERCA), activación de adenilato ciclasa y de piruvato quinasa; reducción de la actividad de 5' desyodasa. T_3 y T_4 deprimen la sensibilidad de la citocromo oxidasa a la inhibición por ATP, lo que explica su rápida acción sobre la respiración mitocondrial.

La tabla 26-2 presenta un resumen de acciones de hormonas tiroideas en concentraciones fisiológicas, y en casos de deficiencia y exceso.

Cuadros clínicos por alteración de la función tiroidea

Hipofunción. Existen cuadros de hipotiroidismo congénito producidos por alteraciones ge-

néticas que afectan a alguna de las enzimas comprometidas en la biosíntesis de hormona tiroidea. El desarrollo insuficiente o ausencia congénita de actividad tiroidea produce el cuadro de *cretinismo*, en el cual hay trastornos de crecimiento (enanismo) y retardo mental. Si el hipotiroidismo se inicia en la adultez, uno de los síntomas llamativos es el *mixedema*, producido por acumulación de glucosaminoglicanos y agua en el tejido celular subcutáneo, con engrosamiento y aspecto "pastoso" de la piel. La tabla 26-2 resume los síntomas del hipotiroidismo.

El hipotiroidismo congénito no tratado produce daños cerebrales severos e irreversibles. La incidencia de este *hipotiroidismo congénito* es de 1 en 4.000 a 5.000 nacimientos. Esto exige el diagnóstico precoz mediante programas sistemáticos de detección en todos los recién nacidos, a fin de iniciar el tratamiento dentro del primer mes de vida.

El *bocio simple* o *endémico* es un cuadro de hipotiroidismo debido a aporte inadecuado de yoduro en los alimentos. En algunas regiones, en general alejadas del mar y rodeadas por cadenas montañosas, el contenido de yodo en suelos y aguas es muy pobre y, como consecuencia, los alimentos allí producidos carecen de dicho elemento. La carencia de yodo en la alimentación frena la síntesis de hormonas tiroideas; se produce hipertrofia de la glándula como fenómeno compensatorio, con hipofunción por déficit de hormona. Este trastorno es llamado también *bocio regional endémico*.

Se estima que mil millones de personas en el mundo habitan áreas deficientes en yodo.

Cuando falta el I durante el embarazo, la producción de hormonas tiroideas cae, con daños irreversibles en el sistema nervioso central del feto causantes de *cretinismo*.

La adición de yoduro de potasio a la sal de cocina de uso común es el recurso más efectivo para eliminar el problema de la carencia de yodo.

Existe hipotiroidismo autoinmune (*enfermedad de Hashimoto*) en el cual el paciente produce anticuerpos contra su propia tiroides.

Hiperfunción. La tabla 26-2 presenta alteraciones provocadas por el exceso de actividad tiroidea.

El *bocio hipertiroideo* presenta aumento del tamaño de la glándula con hiperfunción. En el llamado *bocio tóxico* o *enfermedad de Graves-Basedow* hay hiperfunción tiroidea por exceso de estimulación de la glándula, que no se debe a incremento de hormona tiroestimulante hipofisaria (TSH); por el contrario, la hormona está disminuida notablemente por retroalimentación debida a los elevados niveles de hormonas tiroideas. La enfermedad es de carácter autoinmune; los pacientes afectados producen inmunoglobulinas G (IgG) denominadas *anticuerpos estimulantes de tiroides*. A diferencia de otros anticuerpos contra receptores, que son inhibitorios, éstos se unen a los receptores de TSH y provocan estimulación de la glándula, no regulable por retroalimentación. Producen aumento sostenido de la producción y secreción de T_3 y T_4. Originalmente estos anticuerpos eran designados *estimuladores tiroideos de acción prolongada* (LATS, del inglés *long acting thyroid stimulator*).

Tabla 26-2. Acciones de hormonas tiroideas.

	Hipotiroidismo	*Normal*	*Hipertiroidismo*
Tasa metabólica	↓ Metabolismo basal	Normal	↑ Metabolismo basal
Proteínas	↓ Síntesis ↓ Degradación	Anabólicas	↑ Degradación ↑ Creatinuria
Lípidos	↓ Síntesis ↓ Degradación ↑ Colesterol sérico	↑ β-oxidación ↑ Lipólisis ↑ Lipogénesis	↑ Síntesis ↑ Degradación ↓ Colesterol sérico
Glucosa	↓ Glucólisis	Normal	↑ Glucólisis Test de tolerancia a la glucosa anormal
Glucógeno	↓ Glucogenólisis ↑ Reserva de glucógeno	Normal	↑ Glucogenólisis ↓ Reserva de glucógeno
Sistema nervioso simpático			Mimetiza los efectos de la estimulación β-adrenérgica
Sistema cardiovascular	↓ Amplitud de ondas ECG	↑ Frecuencia cardíaca ↑ Volumen minuto ↑ Contractilidad	↑ Amplitud de ondas ECG

SUPRARRENALES

Las glándulas suprarrenales están constituidas por dos zonas claramente diferenciadas: a) La cortical o corteza, de origen mesodérmico, produce hormonas esteroides esenciales para la vida. b) La medular o médula, funcionalmente considerada parte del sistema nervioso autónomo, produce catecolaminas idénticas a las liberadas en otras formaciones del sistema adrenérgico.

Ambas zonas constituyen glándulas diferentes y serán consideradas separadamente.

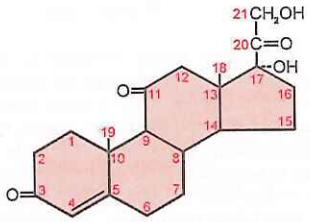
CORTEZA SUPRARRENAL

Según la disposición de los elementos celulares es posible distinguir en la corteza tres capas: a) externa o *glomerular*, b) media o *fascicular*, c) interna o *reticular*. Estas distintas zonas tienen especialización respecto al tipo de hormonas sintetizadas. Sin embargo, la separación funcional entre las dos capas más internas, fascicular y reticular, no tiene límites precisos. Ambas pueden ser consideradas como una unidad.

La corteza suprarrenal o adrenal produce potentes hormonas, todas relacionadas estructuralmente con el ciclopentanoperhidrofenantreno.

De acuerdo con sus funciones generales, las hormonas de corteza adrenal se agrupan en tres categorías, con actividades fisiológicas diferenciadas:

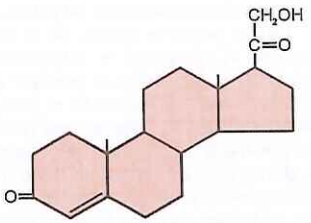
1. *Glucocorticoides*. Poseen efecto primario sobre el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y proteínas. Son producidos predominantemente en la zona fasciculada (en menor proporción, también en la reticular).



Cortisona

Cortisol (Hidrocortisona)

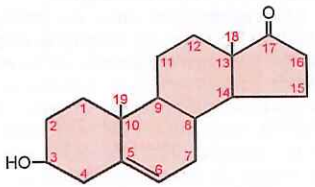
Glucocorticoides



Desoxicorticosterona

Aldosterona

Mineralocorticoides

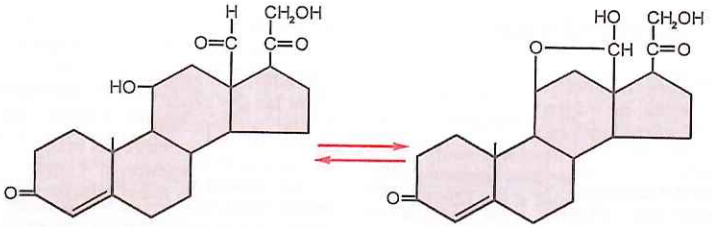


Deshidroepiandrosterona

Androstenediona

Andrógenos

Fig. 26-9. Hormonas de corteza adrenal.



Forma aldehído Forma hemiacetal

Fig. 26-10. Formas de la aldosterona.

2. *Mineralocorticoides*. Afectan primordialmente el transporte de electrólitos y la distribución de agua en los tejidos. Son secretados por células de la zona glomerular.

3. *Corticoides androgénicos*. Sus efectos principales se manifiestan sobre los caracteres sexuales secundarios. Son sintetizados preferentemente en la zona reticular (también en la fasciculada).

Esta división atiende a las propiedades dominantes de cada hormona, pero debe tenerse en cuenta que las hormonas de un grupo determinado pueden presentar, además de la actividad indicada, efectos menores del tipo propio de corticoides de otro grupo.

De la corteza adrenal se ha aislado y caracterizado gran cantidad de esteroides, pero sólo unos pocos poseen actividad biológica. Entre éstos, los glucocorticoides cortisona e hidrocortisona o cortisol; los mineralocorticoides desoxicorticosterona (DOC) y aldosterona y los andrógenos androstenediona y deshidroepiandrosterona (DHEA). De los esteroides mencionados, sólo cortisol y aldosterona pueden demostrarse en sangre circulante, en la cual se encuentra corticosterona.

Los glucocorticoides y mineralocorticoides tienen en común las siguientes características estructurales (fig. 26-9): a) función cetona en carbono 3; b) doble ligadura entre carbonos 4 y 5; c) cadena lateral de dos carbonos en C17. En ambos tipos de hormonas esta cadena posee una función cetona y un alcohol primario. La presencia de un grupo hidroxilo en C17 es exclusiva de los glucocorticoides. Además, éstos siempre presentan hidroxilo o cetona en C11.

La aldosterona posee función aldehído en C18. En los andrógenos no existe cadena lateral; el C17 tiene una función cetona. La doble ligadura del ciclo puede estar entre los carbonos 4 y 5 o 5 y 6 (fig. 26-9).

El *cortisol* es el glucocorticoide más importante en el ser humano. El mineralocorticoide más potente es la *aldosterona*. Esta hormona puede presentar forma aldehídica o hemiacetálica (fig. 26-10). En solución se encuentra como hemiacetal. La presencia de un hidroxilo en C11 otorga a la aldosterona algo de actividad glucocorticoide.

Biosíntesis

El camino inicial obligado en la síntesis de esteroides es la producción de colesterol a partir de acetatos activos. La corteza adrenal es relativamente rica en colesterol; aunque éste puede ser sintetizado en la propia glándula, la mayor parte, que representa el 80% del total utilizado, es captada de las LDL del plasma por receptores LDL en la membrana plasmática. Ante estímulos agudos, una *proteína esteroidogénica regulatoria* (StAR, de *steroidogenic acute regulatory protein*) actúa como mediadora del transporte de colesterol desde la membrana mitocondrial externa a la matriz.

En las primeras etapas de la síntesis de esteroides, el colesterol es hidroxilado en los carbonos 20 y 22; luego se produce ruptura de la cadena lateral por acción de la *20,22-desmolasa*. Esta desmolasa es inducida por ACTH en las zonas fascicular y reticular y por angiotensina II en la glomerular. Se separa un trozo de 6 carbonos (isocaproato) y queda, sobre el C17, un resto de dos carbonos con una función cetona. El compuesto formado es la *pregnenolona*; su producción es catalizada por un complejo multienzimático localizado en mitocondrias.

La pregnenolona sirve de intermediario en la síntesis de todas las hormonas esteroides. Las transformaciones siguientes, en su mayoría, son deshidrogenaciones e hidroxilaciones catalizadas por enzimas que requieren oxígeno molecular y NADPH como coenzima; comprenden oxigenasas de función mixta, ligadas a citocromo P_{450}. Por acción de una *deshidrogenasa* específica se oxida el C3; una *isomerasa* cambia la doble ligadura entre carbonos 5 y 6 a los carbonos 4 y 5; la pregnenolona se convierte en *progesterona*.

A partir de progesterona se sintetizan mineralo- y glucocorticoides. Las reacciones siguientes son catalizadas por hidroxilasas específicas que agregan grupos hidroxilos en las posiciones C11, C17 o C21. Las enzimas que participan en estas vías biosintéticas se encuentran en mitocondrias y en retículo endoplásmico. La hidroxilación en C21 se produce en todos los compuestos con actividad gluco- y mineralocorticoide.

La síntesis de aldosterona, el mineralocorticoide más importante, requiere hidroxilación en C18. La actividad C18 hidroxilasa está restringida a las células de la capa glomerular.

El principal andrógeno adrenal, *deshidroepiandrosterona*, se produce por eliminación de la cadena lateral y oxidación en C17, con formación de una cetona. La figura 26-11 resume las vías de síntesis de los principales esteroides adrenales.

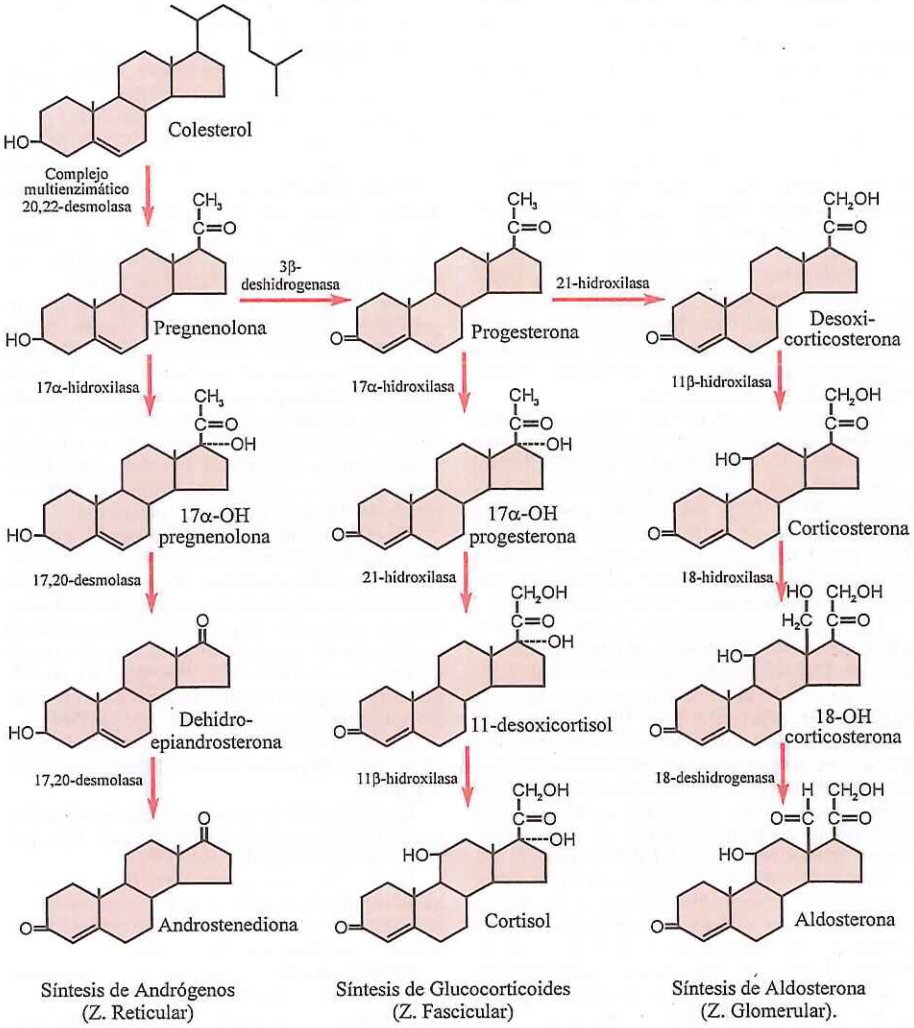


Fig. 26-11. Biosíntesis de esteroides adrenales.

Como la zona glomerular, productora de aldosterona, no posee 17α-hidroxilasa, no puede sintetizar 17α-OH-pregnenolona ni 17α-OH-progesterona, precursores de cortisol y andrógenos respectivamente.

Transporte en plasma. Una vez sintetizados, los esteroides pasan con rapidez a la sangre. En un adulto normal se secretan por día entre 5 y 30 mg de cortisol, 1 a 6 mg de corticosterona y 50 a 100 μg de aldosterona.

El plasma contiene cortisol en una concentración de 5 a 15 μg por dL; de esta cantidad, alrededor del 10% se encuentra al estado libre, biológicamente activo. El cortisol es el corticoide más abundante en el plasma. La concentración de aldosterona es mucho más baja, alrededor de 0,02 μg por dL.

Las hormonas corticoadrenales son transportadas, en parte, ligadas a proteínas plasmáticas. La unión a las proteínas es tanto más fuerte cuanto menor es la polaridad del corticoide. La androstenediona, con dos funciones cetona, forma un complejo más firme con las proteínas transportadoras que la molécula más polar del cortisol (posee dos cetonas y tres hidroxilos). La unión es de tipo no covalente (interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno) y es fácilmente reversible en condiciones fisiológicas.

La *transcortina* (CBG del inglés *corticosteroid binding globulin*) y la albúmina sérica unen corticoides y los vehiculizan en sangre. Cortisol y corticosterona se unen preferentemente a transcortina (CBG); 77% del cortisol normalmente presente en sangre es transportado por CBG y 15%, por albúmina; queda algo más del 7% libre en plasma (aproximadamente 1 μg/dL). El cortisol tiene una vida media de 70 a 120 minutos.

La aldosterona, en cambio, se une menos a la CBG; gran parte (30 al 50% del total) se encuentra libre. La hormona libre es la forma biológicamente activa y está en equilibrio con la ligada a proteínas. Su vida media es de 10 a 20 minutos.

Inactivación y excreción. Los esteroides llegados a la circulación son rápidamente eliminados del organismo; a las 48 horas se ha excretado prácticamente todo. El hígado es el principal responsable de la inactivación de corticoesteroides. Sufren reducción del doble enlace y del grupo cetona en C3, convertido en hidroxilo y conjugado con ácido glucurónico y, en menor proporción, con sulfato. Los corticoesteroides conjugados se excretan con la bilis hacia el intestino, donde son parcialmente reabsorbidos y devueltos al hígado por la circulación portal (ciclo enterohepático). La excreción principal tiene lugar por vía urinaria.

Los metabolitos producidos a partir de corticoides androgénicos se excretan por orina como 17-cetoesteroides conjugados con ácido glucurónico. Los 17-cetoesteroides urinarios derivan tanto de los andrógenos adrenales como de los producidos en las gónadas. En la mujer y en el niño, todos los 17-cetoesteroides eliminados por orina proceden de corteza suprarrenal. En el varón la cantidad excretada es mayor, pues se adicionan los derivados de hormonas testiculares. Los testículos contribuyen con un tercio del total de 17-cetoesteroides urinarios.

Regulación de la síntesis y secreción. La síntesis y secreción de esteroides suprarrenales es estimulada por adrenocorticotrofina (ACTH) de adenohipófisis. Esta hormona trófica actúa preferentemente sobre la zona fascicular de la corteza.

La secreción de ACTH, a su vez, es regulada por el factor liberador de corticotrofina (CRH) y por arginina-vasopresina producidos en el hipotálamo y por agentes estresantes. El nivel de esteroides adrenales circulantes también controla, por retroalimentación, la secreción de ACTH.

Los niveles de ACTH y cortisol en plasma presentan variaciones paralelas. Ambos tienen un ritmo circadiano; suben durante la noche para llegar a un máximo en las últimas horas de sueño y luego declinan progresivamente durante el día hasta un mínimo después del anochecer. Hay pequeños incrementos producidos por la ingestión de alimentos o el ejercicio. El estrés, tanto físico como psíquico, también eleva las concentraciones de ACTH y cortisol en la circulación.

La estimulación de la adrenal por ACTH provoca rápida disminución del contenido de colesterol y de ácido ascórbico en la glándula. Este fenómeno es un índice de la activación de la síntesis de esteroides. El papel del ácido ascórbico o vitamina C, compuesto abundante en corteza adrenal, no se conoce con exactitud. Es posible que actúe cediendo equivalentes reductores para las hidroxilaciones dependientes de NADPH.

La secreción de cortisol es inhibida por somatostatina, heparina, factor natriurético atrial y dopamina.

La producción de aldosterona en las adrenales es estimulada por angiotensina II (pág. 559), potasio y, en menor grado, por ACTH.

La ACTH se une a receptores de la membrana de células de la corteza suprarrenal y produce activación de adenilato ciclasa. De este modo, su acción es mediada por AMP cíclico.

Mecanismo de acción. Todos los esteroides poseen acción primaria sobre el material genético nuclear, estimulando la transcripción. Las hormonas de la corteza atraviesan la membrana

celular por difusión simple y se unen a receptores específicos pertenecientes a la familia de receptores de esteroides. Estos se localizan en cito- y nucleoplasma, formando complejos inactivos con proteínas de shock térmico (HSP90). Los receptores de glucocorticoides son relativamente más abundantes en el citosol.

Los receptores son polipéptidos de unos 94 kDa cuya molécula presenta tres dominios, uno central, con dos "dedos de zinc" que reconoce y se une a *elementos de respuesta* en el ADN; el dominio situado hacia el extremo N-terminal también interacciona con el ADN. En el segmento correspondiente al C-terminal se encuentra el sitio de unión a la hormona. La fijación del corticoide provoca separación de la HSP y dimerización del receptor, que se traslada hacia el núcleo, se fija a secuencias definidas del ADN (próximas a sitios promotores o potenciadores) y actúa como un factor de transcripción (fig. 22-2); también puede interactuar con otros factores de transcripción, como el factor nuclear κB (NFκB), importante regulador de genes de citoquinas. Estimula la síntesis de ARNm y, en última instancia, la de proteínas específicas. Los efectos metabólicos promovidos por corticoesteroides, en gran parte se deben a cambios en la producción de enzimas.

Se han reconocido dos clases de receptores de hormonas de corteza adrenal, los de glucocorticoides y los de mineralocorticoides. Los receptores de glucocorticoides (GR) son específicos para las hormonas del grupo; en cambio, los receptores de mineralocorticoides (MR) tienen igual afinidad para aldosterona y cortisol. A pesar de esta relativa inespecificidad y de la mayor concentración de cortisol (supera en 2 o 3 órdenes de magnitud a la de mineralocorticoides), en los tejidos "blanco" (epitelios de riñón, colon y glándulas salivares) sólo la aldosterona provoca respuesta. Esto se explica por la existencia, en esos tejidos, de 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, que convierte el cortisol en un derivado inactivo, la cortisona.

Acciones metabólicas. Glucocorticoides. Producen aumento de glucosa, ácidos grasos libres y aminoácidos en sangre circulante.

En *tejidos periféricos* (epidermal, adiposo, conjuntivo, muscular) deprimen las vías de utilización de glucosa, principalmente la glucólisis; estimulan la degradación de proteínas (acción catabólica). Cantidades elevadas de cortisol inhiben la división celular y la síntesis de ADN en la piel; en tejido conjuntivo reducen la síntesis de colágeno, en músculo disminuyen la síntesis de proteínas, lo que puede producir atrofia. En tejido adiposo activan la lipólisis, con liberación de ácidos grasos y favorecen su degradación. Paradójicamente, a pesar del incremento de la lipólisis, el exceso sostenido de glucocorticoides aumenta el depósito de grasas. Esto se explicaría por la activación de la diferenciación de adipocitos que promueve la adipogénesis y de genes que controlan la síntesis de lipoproteína lipasa, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y leptina. Altos niveles de cortisol estimulan del apetito y se acompañan de hiperinsulinemia.

En *hígado* aumenta la síntesis de proteínas, especialmente de enzimas comprometidas en el metabolismo de aminoácidos, como diversas aminotransferasas y triptófano pirrolasa y de las enzimas clave en la regulación de la gluconeogénesis: piruvato carboxilasa, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa y glucosa-6-fosfatasa. Los genes que codifican para la síntesis de estas enzimas pueden ser influidos simultáneamente por el mismo agente, en este caso glucocorticoides. Los cambios enzimáticos mencionados resultan en activación de la gluconeogénesis a partir de aminoácidos.

La estimulación de la gluconeogénesis en hígado, la disminución del consumo de glucosa en tejidos periféricos y el aumento del catabolismo de lípidos y proteínas favorecen la elevación del nivel de glucosa circulante (hiperglucemia). Hay también aumento del depósito de glucógeno en hígado. (Tabla 26-3).

Tabla 26-3. Acciones metabólicas de glucocorticoides (cortisol).

En tejidos periféricos (muscular, adiposo, linfoide)
↓ Glucólisis y consumo de glucosa
↑ Degradación de proteínas
↓ Síntesis de proteínas
En tejido adiposo
↑ Lipólisis
↓ Síntesis de ácidos grasos y triacilgliceroles
En hígado
↑ Síntesis de ARN y proteínas (inducción de enzimas)
↑ Gluconeogénesis a partir de aminoácidos
↑ Producción de urea

Los glucocorticoides tienen un efecto permisivo sobre otras hormonas, como catecolaminas y glucagón, que resulta en resistencia a la insulina.

Presión sanguínea. Concentraciones elevadas de glucocorticoides aumentan la sensibilidad del músculo liso vascular a agentes presores como catecolaminas y angiotensina II, reducen el efecto vasodilatador del óxido nítrico y aumentan la síntesis de angiotensinógeno.

Inflamación e inmunidad. Los niveles de glucocorticoides normalmente presentes en sangre deprimen la actividad del sistema inmune. En concentraciones superiores a las fisiológicas, el cortisol es un potente *antiinflamatorio* y *depresor de la respuesta inmunitaria*. En sangre periférica estimula la apoptosis de linfocitos, con lo que se reduce su número, disminuyen rápidamente los eosinófilos, la diferenciación de monocitos en macrófagos y la actividad fagocitaria y citotóxica de éstos.

Estas acciones se ejercen principalmente por modulación de la expresión de genes específicos. Por ejemplo, los glucocorticoides reprimen genes que codifican varias citoquinas (interleuquina 1 y factor de necrosis tumoral entre otros) y enzimas proinflamatorias (isoformas inducibles de ciclooxigenasa, COX-2, y de óxido nítrico sintasa, NOS). También inducen genes que dirigen la síntesis de proteínas y péptidos antiinflamatorios (inhibidores de proteasas, *lipocortina 1* y *anexinas*). El complejo receptor-cortisol se une al factor nuclear κB (NFκB) y, como consecuencia, puede prevenir la iniciación del proceso inflamatorio.

Se ha propuesto que otro efecto mediado por cortisol sería la inhibición de la fosfolipasa A_2; que disminuye la liberación de araquidonato, precursor de eicosanoides y reduce la producción de prostaglandinas y compuestos relacionados.

El cortisol además estabiliza las membranas lisosomales y disminuye la liberación de enzimas que contribuyen al proceso inflamatorio.

Altas dosis de cortisol inhiben los mecanismos de defensa contra las infecciones, especialmente la inmunidad celular (disminuye particularmente el número de linfocitos T circulantes). Aparentemente, la producción de anticuerpos por linfocitos B no es mayormente afectada.

En clínica se aprovecha la capacidad de los glucocorticoides de inhibir la respuesta inmune y se utilizan para atenuar las consecuencias de reacciones inmunes indeseables o exageradas (reacciones alérgicas y anafilácticas), en procesos inflamatorios crónicos (artritis reumatoidea) o para deprimir la reacción de rechazo de órganos trasplantados.

Homeostasis del calcio. Los glucocorticoides disminuyen la absorción intestinal y la reabsorción renal de calcio, lo cual tiende a reducir los niveles de calcio en plasma y a estimular la secreción de hormona paratiroidea. Como resultado hay reabsorción de hueso, que explica la osteopenia y osteoporosis característicos del exceso de cortisol. Disminuye la formación de hueso, se deprime la proliferación de fibroblastos y la formación de colágeno.

Acciones no genómicas. Las acciones más importantes de las hormonas esteroideas, en general, se ejercen a través de sus receptores nucleares, modificando la actividad génica. Las respuestas se producen con cierto retardo, ya que alcanzan su máxima expresión después de varias horas, o incluso días. Sin embargo, se observan algunas respuestas rápidas, desencadenadas por otras vías, todavía no bien conocidas, pero indudablemente *no genómicas*.

Entre las respuestas de este tipo inducidas por glucocorticoides se cita la activación de óxido nítrico sintasa, que resulta en dilatación vascular.

Mineralocorticoides. Su principal función es el mantenimiento de las concentraciones normales de Na^+ y K^+ y del volumen del líquido extracelular.

Los receptores de mineralocorticoides (MR) tienen una expresión específica de tejidos. Por ejemplo, la mayor concentración de estos receptores se encuentra en nefrón distal, colon e hipocampo. Los más pobres en MR son el resto del tracto gastrointestinal y el miocardio.

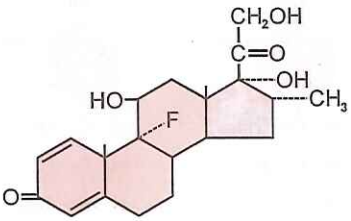
Al tiempo que aumenta la reabsorción de Na^+ en los túbulos renales, disminuye su excreción en células sudoríparas, salivales y tracto gastrointestinal.

La aldosterona es el corticoide más potente en relación con la retención de sodio. Es unas 35 veces más activa que la 11-desoxicorticosterona (DOC) y unas 1.000 veces más que el cortisol.

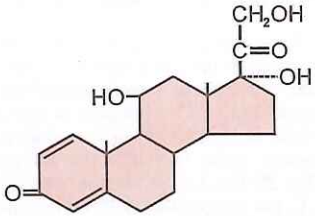
Actúa en el nefrón distal (última porción del túbulo contorneado distal y de los tubos colectores). El aumento de la volemia causado por la aldosterona estimula la liberación de péptido natriurético atrial, que promueve excreción renal de Na^+ y agua.

En células de los túbulos, el Na^+ penetra, a través de canales en la membrana luminal, a favor del gradiente; con él ingresa también cloruro. Esta absorción de sodio es posible en la medida en que la Na^+,K^+-ATPasa expulse Na^+ intracelular hacia el intersticio. La aldosterona induce incremento del número de canales de Na^+ en la membrana apical y de Na^+,K^+-ATPasa en membrana basolateral de células de túbulos y conductos colectores renales. Como consecuencia de la mayor absorción de Na^+ aumenta la negatividad en la luz tubular y se activa la secreción de K^+.

Los mineralocorticoides intervienen así en la regulación de la distribución de sodio y potasio en los espacios intra- y extracelular. Como el movimiento de iones es acompañado por desplazamiento de agua, los mineralocorticoides constituyen un importante factor en la regulación del volumen de los compartimientos hídricos del organismo (Tabla 26-4).



Dexametasona



Prednisolona

Fig. 26-12. Corticoides sintéticos.

Tabla 26-4. Acciones metabólicas de mineralocorticoides (aldosterona).

↑ Absorción de sodio y cloruro en túbulos renales
↑ Excreción urinaria de potasio
↑ Volumen de líquido extracelular
↑ Síntesis de ARN y proteínas

La falta de estas hormonas determina pérdida excesiva de sodio, cloruro y agua por orina, con retención de potasio en el espacio extracelular. Se produce hiponatremia con hiperpotasemia y se altera el equilibrio ácido-base. La pérdida de sodio y agua reduce el volumen plasmático y determina hipotensión arterial. Estos trastornos son los principales responsables del coma final y la muerte que produce la falta de corticoides adrenales.

Entre las proteínas inducidas por mineralocorticoides se encuentran enzimas del ciclo del ácido cítrico, principalmente citrato sintasa. La mayor disponibilidad de enzimas activa el funcionamiento del ciclo de Krebs y, con ello, la producción de ATP utilizable por la bomba de sodio.

Acciones no genómicas. Es posible que la aldosterona se una a receptores diferentes de los MR nucleares y active sistemas de señales determinantes de cambios en la concentración de AMPc y de la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$. Se ha observado aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en músculo esquelético. La aldosterona tiene efecto inotrópico en miocardio. Estas acciones se manifiestan a los pocos minutos.

La división funcional de los corticoides es un tanto esquemática. Un glucocorticoide no está totalmente desprovisto de acción sobre el equilibrio hidromineral. Muchos de los inconvenientes de tratamientos prolongados con glucocorticoides suelen originarse por los efectos sobre los intercambios de Na^+, Cl^-, K^+ y agua.

Corticoides androgénicos. Los principales son *deshidroepiandrosterona* (DHEA) y *androstenediona* (fig. 26-29). Tienen débil acción androgénica y anabólica proteica; pueden ser convertidos, en tejidos periféricos, en testosterona, y aun en estrógenos. No influyen sobre los movimientos de Na^+, K^+ y agua. La corteza adrenal es la principal fuente de andrógenos en la mujer; cuando se producen en cantidades excesivas determinan masculinización.

Corticosteroides sintéticos. Se han obtenido esteroides sintéticos con mayor actividad que las hormonas naturales. La introducción de flúor en posición 9, o de una doble ligadura entre carbonos 1 y 2, o de un metilo en posición 16, aumenta la afinidad por los receptores. Varios de estos compuestos son muy utilizados en la práctica clínica. En la figura 26-12 se muestran dexametasona y prednisolona; la primera es unas 30 veces más potente que el cortisol.

Otros productos actúan como inhibidores competitivos. La espironolactona (aldactona) es antagonista de aldosterona; se une a los receptores de esta hormona para formar complejos inactivos.

Alteraciones en la producción y secreción de hormonas corticoadrenales

Hipofunción. La deficiencia de hormonas corticoadrenales produce la *enfermedad de Addison*. Los pacientes presentan pérdida de iones sodio y cloruro, retención de potasio (acidosis hiperkaliémica), hipoglucemia, hipotermia, aumento de pigmentación cutánea, debilidad muscular, caquexia. Como el nivel de corticosteroides en sangre es muy bajo o nulo, en estos enfermos no hay retrocontrol sobre adenohipófisis; aumenta la secreción de ACTH. Esto explica la hiperpigmentación, ya que de la misma molécula precursora de ACTH (y aun de este mismo) se originan hormonas melanocitoestimulantes (MSH).

Hiperfunción. Se observa en la hiperplasia o en tumores funcionantes de corteza suprarrenal y en casos de secreción exagerada de ACTH (tu-

mor de células basófilas de adenohipófisis). La hiperproducción puede estar limitada a glucocorticoides, a mineralocorticoides, o a andrógenos.

Síndrome de Cushing. Resulta del exceso de glucocorticoides; se caracteriza por hiperglucemia, trastornos en el balance hidromineral, adiposidad (cara en "luna llena"), osteoporosis y atrofia muscular.

Aldosteronismo primario. El aumento en la secreción de aldosterona incrementa la excreción urinaria de potasio; hay hipokaliemia y reducción del potasio total en el organismo.

Se ha descripto un cuadro hereditario de seudoaldosteronismo o *exceso aparente de mineralocorticoides*. Los pacientes carecen de actividad 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, la enzima que convierte cortisol en cortisona. El cortisol se fija a receptores MR, mientras la cortisona tiene muy poca afinidad por ellos. Cuando falta la enzima mencionada, en los tejidos "blanco" de los mineralocorticoides queda un exceso relativo de cortisol no "inactivado" a cortisona. El cortisol se une a receptores MR y ejerce intensa acción mineralocorticoide.

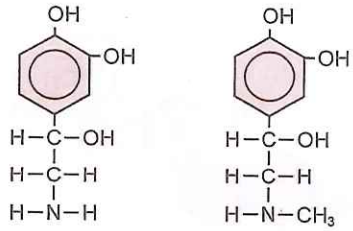
Síndrome adrenogenital. La producción exagerada de andrógenos es causa de virilización en mujeres (desarrollan caracteres sexuales secundarios masculinos) y seudopubertad precoz en varones. El defecto es genético; compromete enzimas involucradas en la biosíntesis de hormonas corticoadrenales. No en todos los casos se produce virilización.

En la *hiperplasia adrenocortical* falta *21-hidroxilasa*. Los pacientes afectados no pueden producir cortisol, desoxicortisol, corticosterona o aldosterona en cantidades normales. La disminución de la secreción de cortisol aumenta los niveles de ACTH, que estimula la síntesis de esteroides. Se acumulan los metabolitos que preceden al punto de bloqueo, entre los cuales se encuentran los andrógenos. Durante la vida intrauterina, esto produce masculinización de fetos femeninos.

Si la falla radica en el próximo paso, *11β-hidroxilasa*, se acumula desoxicorticosterona, un mineralocorticoide. Los pacientes retienen exageradamente Na^+ y agua y excretan K^+ en exceso. También hay aumento de andrógenos y masculinización. La falta de *3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa* es letal.

MÉDULA SUPRARRENAL

La médula adrenal es considerada como una porción diferenciada del sistema nervioso simpático.



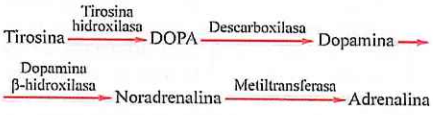
Noradrenalina Adrenalina

Fig. 26-13. Hormonas de la médula suprarrenal.

Las células cromafines que constituyen esta glándula producen las *catecolaminas*, sustancias compuestas por catecol (ortodihidroxibenceno) con un grupo amina. Comprenden la *epinefrina* o *adrenalina*, la *norepinefrina* o *noradrenalina* y la *dopamina*, todas derivadas del aminoácido tirosina (fig. 26-13). Los productos naturales son isómeros L; los compuestos de la serie D poseen escasa actividad.

La adrenalina se produce principalmente en la médula adrenal, la noradrenalina se sintetiza predominantemente en los nervios periféricos del sistema simpático. La dopamina, precursora de ambas, se encuentra en nervios simpáticos periféricos, en neuronas especializadas del sistema nervioso central, de los ganglios simpáticos y cuerpo carotídeo, en los que actúa como neurotransmisor.

Biosíntesis. La vía de síntesis de catecolaminas a partir de tirosina ha sido ya descripta (pág. 346). El paso inicial es la conversión de tirosina en dihidroxifenilalanina (DOPA) por acción de *tirosina hidroxilasa*. DOPA es convertida en dopamina en reacción catalizada por una *descarboxilasa*. La dopamina se almacena en vesículas (gránulos cromafines) detectables en células de la médula adrenal y en neuronas del sistema simpático. Estas vesículas contienen dopamina α-hidroxilasa, responsable de la conversión de dopamina en noradrenalina. La última etapa es catalizada por *feniletanolamina-N-metiltransferasa* (PNMT), enzima citosólica; la noradrenalina debe salir de la vesícula para ser transformada en adrenalina y reingresar como tal a los gránulos de secreción. La PNMT es inducida por cortisol.



La síntesis de catecolaminas es regulada por retroalimentación. Adrenalina y noradrenalina inhiben alostéricamente a la tirosina hidroxilasa.

La gran mayoría de células cromafines en médula adrenal sintetiza adrenalina, sólo en el 10% del total de células la vía termina con la formación de noradrenalina. Los productos de secreción de la médula adrenal se almacenan en vesículas rodeadas por una membrana, en un proceso que requiere energía, suministrada por ATP. La relación molar catecolaminas/ATP es aproximadamente 4:1. Dentro de las vesículas la concentración de ATP es unas 30 veces mayor que en el citosol. En las vesículas se encuentran también péptidos, entre ellos *cromograninas*, *precursores de encefalinas*, *adrenomedulina*, *ACTH* y *péptido intestinal vasoactivo*.

Secreción. La liberación del contenido de las vesículas es desencadenado por impulsos nerviosos que determinan el ingreso de Ca^{2+} en la célula. Las vesículas se desplazan hacia la membrana plasmática, se fusionan con ella, se abren al exterior y descargan su contenido (exocitosis).

Cada vesícula libera unos 3 millones de moléculas de catecolaminas, 800.000 de adenilatos (ATP), 5.000 de cromograninas y varios miles de precursores de encefalinas o encefalinas libres.

En la circulación, aproximadamente la mitad de las catecolaminas se unen laxamente a albúmina. Su vida media es de 10 a 100 segundos.

Inactivación. La mayor parte de las catecolaminas secretadas es metabolizada en los tejidos, principalmente hígado, por oxidación de la cadena aminada y metilación de uno de los grupos fenólicos. Las principales enzimas comprometidas en estas reacciones son *monoaminooxidasa* (MAO) y *catecol-ortometiltransferasa* (COMT).

La MAO, localizada en membrana mitocondrial externa, tiene amplia especificidad de sustrato. Cataliza la oxidación de cadenas laterales de varias monoaminas. La COMT es una enzima citosólica responsable de la reacción de metilación del grupo hidroxilo en posición 3; el donante de metilo es S-adenosil metionina. La enzima actúa sobre diversas catecolaminas. El hígado es particularmente rico en MAO y COMT; en este órgano se inactiva la mayor parte de las catecolaminas circulantes.

El primer paso en la inactivación de una catecolamina puede ser indistintamente oxidación o metoxilación catalizadas por MAO o COMT respectivamente (fig. 26-14). Cualquiera sea el orden de las reacciones, los productos finales son

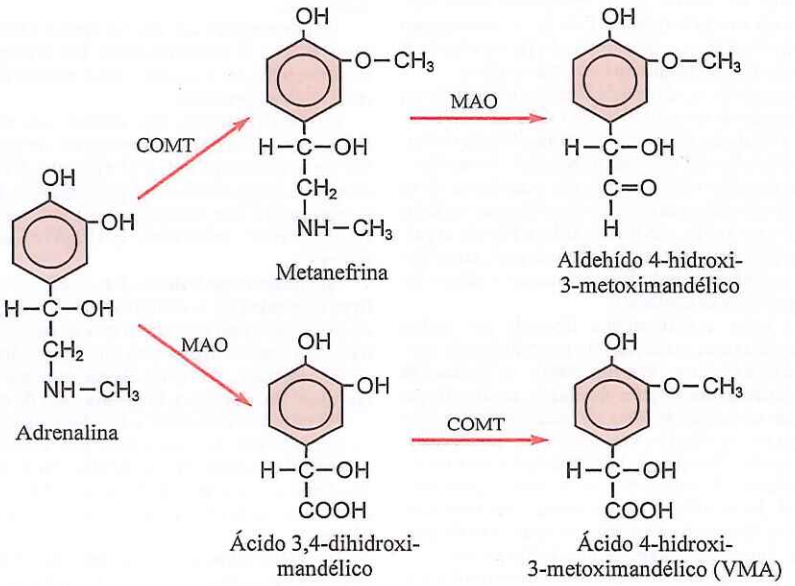


Fig. 26-14. Inactivación de adrenalina.

los mismos, pues actúan ambas enzimas. Los metabolitos se excretan por orina, en su mayor parte conjugados con sulfato o glucuronato. Uno de los principales metabolitos urinarios generados a partir de adrenalina y noradrenalina es el ácido 4-hidroxi-3-metoxi-mandélico, también llamado *ácido vanilmandélico* o *vainillilmandélico* (VMA). Otro metabolito eliminado por orina en cantidades significativas es la 3-metoxiadrenalina o *metanefrina*.

Aproximadamente la mitad de metabolitos excretados corresponden a metanefrinas, 35% a ácido vanilmandélico, 10% a catecolaminas conjugadas y otros metabolitos; menos del 5 a catecolaminas libres.

Mecanismo de acción. Las catecolaminas se unen a receptores específicos en membrana plasmática de las células efectoras. Existen tres grupos de receptores, todos pertenecientes a la familia con siete hélices transmembrana, α (α_1 y α_2), β (β_1, β_2 y β_3) y DA (DA_1 a DA_5).

El mecanismo de acción depende del receptor comprometido. Los receptores α_1 están asociados a proteínas G_q; utilizan la vía del fosfatidilinositolbisfosfato. Los α_2 están acoplados a proteína G_i, con acción inhibitoria sobre la adenilato ciclasa; reducen el nivel de AMPc. Los receptores β_1 y β_2 se relacionan con proteínas Gs; estimulan la adenilato ciclasa y elevan la concentración intracelular de AMPc. Estos receptores están presentes en muchos tejidos. Los β_1 se encuentran preferentemente en corazón y los β_2 en hígado y músculo liso de bronquios, arterias y útero.

Receptores α_1: Son receptores postsinápticos; se encuentran en músculo liso de vasos sanguíneos, esfínteres de tracto gastrointestinal, uréter, piel, dilatador del iris, tracto seminal. Su estimulación produce vasoconstricción y aumento de la presión arterial, contracción de esfínteres en tubo digestivo y vejiga, de uréter, dilatación de la pupila (midriasis), piloerección en la piel, aumento de la sudoración en palma de manos y planta de pies, provoca eyaculación.

α_2: Unen noradrenalina liberada por fibras posganglionares y adrenalina procedente de médula adrenal. Su activación inhibe la liberación de noradrenalina (efecto *feedback* negativo). Se localiza en músculo liso de arteriolas y venas de algunos territorios vasculares; produce vasocontricción. Disminuye la motilidad y promueve contracción de esfínteres en el tracto gastrointestinal. En células β de los islotes del páncreas inhibe la liberación de insulina e induce la de glucagon. Favorece la agregación de plaquetas.

β_1: Predominan en corazón; su estimulación produce aumento de la frecuencia cardíaca (efecto cronotrópico positivo), de la contractilidad del músculo cardíaco (efecto inotrópico), de la conductibilidad y automaticidad cardíacas (efecto dromotrópico). Aumenta el volumen minuto cardíaco. Activa la liberación de renina del aparato yuxtaglomerular en riñón. Induce secreción en glándulas salivales.

β_2: Se localizan preferentemente en hígado y músculo liso de bronquios, arterias y útero. Determinan relajación de músculo liso en bronquios (broncodilatación), en tracto gastrointestinal, en vejiga (inhiben la micción), útero, dilatan arteriolas de coronarias, hígado y músculo esquelético. En hígado activan la glucogenolisis y la gluconeogénesis y en músculo esquelético, la glucogenolisis y la liberación de lactato.

β_3: Regulan el gasto energético, promueven la lipólisis en tejido adiposo. Estimulan la termogénesis en grasa parda.

DA: Se encuentran en sistema nervioso central, terminales adrenérgicos presinápticos, hipófisis, corazón y lechos vasculares renal y mesentérico. Los efectos de DA se ejercen por activación de adenilciclasa. DA_1 predomina en las arterias de cerebro, de riñón, mesentéricas y coronarias; causa vasodilatación. DA_2 se localiza en terminaciones presinápticas, ganglios simpáticos y cerebro. Inhibe la liberación de noradrenalina, la transmisión ganglionar y la liberación de prolactina.

La adrenalina tiene mayor efecto sobre receptores β_2 que la noradrenalina; los efectos sobre receptores β_1, α_1 y α_2 son más o menos similares para ambas hormonas.

Existen fármacos que actúan con selectividad como agonistas o antagonistas de los distintos tipos de receptores. Por ejemplo, fentolamina es un antagonista α; el propranolol, atenolol y metoprolol son bloqueantes de receptores β_1. Isoproterenol, terbutalina y albuterol son agonistas β_2.

Acciones metabólicas. Las acciones metabólicas dependen de la estimulación de receptores β en los órganos efectores; en este sentido, la adrenalina es mucho más activa que la noradrenalina.

En general, las catecolaminas aumentan el consumo de oxígeno y la producción de calor.

En *músculo esquelético*, la adrenalina promueve degradación del glucógeno por activación de la fosforilasa mediada por AMPc. En el músculo en ejercicio, esta acción determina finalmente la formación de ácido láctico y su liberación hacia la sangre.

En *tejido adiposo*, el aumento de AMPc causado por catecolaminas activa la lipasa y estimula la lipólisis, con liberación de ácidos grasos hacia

la circulación. Estos ácidos grasos sirven como combustible en otros tejidos.

En *hígado*, la adrenalina estimula la glucogenólisis e inhibe la glucogenogénesis por inactivación de glucógeno sintasa. Produce aumento de gluconeogénesis, especialmente a partir del lactato que llega por sangre desde los músculos en actividad. La estimulación de la gluconeogénesis y glucogenólisis hepática aumenta la liberación de glucosa hacia la sangre (hiperglucemia). Estos efectos se acentúan por la acción inhibidora que las catecolaminas tienen sobre la liberación de insulina.

El efecto gluconeogénico sería mediado por el *receptor activado por el proliferador de peroxisomas* α (PPARα) (pág. 488). La estimulación de PPARα puede ser causada por el aumento de AMPc, glucocorticoides, o un factor nuclear hepático; activa la expresión de enzimas claves de la gluconeogénesis.

El incremento de la oferta y oxidación de ácidos grasos en tejidos, unido a la menor utilización de glucosa, tiene efecto cetogénico. La Tabla 26-5 resume las acciones metabólicas de la adrenalina.

Tabla 26-5. Acciones metabólicas de adrenalina.

↑ Glucogenólisis
↓ Glucogenogénesis
↑ Glucemia
↑ Producción de lactato en músculo
↑ Gluconeogénesis
↑ Lipólisis en tejido adiposo
↑ Ácidos grasos libres en sangre
↑ β-oxidación de ácidos grasos en tejidos periféricos

Los efectos generales desencadenados por las catecolaminas, tanto las respuestas cardiovasculares y viscerales como las metabólicas, tienden a preparar al organismo para enfrentar situaciones de emergencia o estrés que requieren gasto extra de energía (respuestas de "lucha" o "huida").

Además de catecolaminas, la médula adrenal sintetiza otras hormonas, entre ellas la *adrenomedulina*, péptido de 52 aminoácidos cuya acción se ejerce a través de un receptor acoplado a proteína G que produce elevación de AMPc en las células efectoras. Es un potente vasodilatador y natriurético.

Las cromograninas han sido aisladas en otras glándulas endocrinas y en cerebro; no se conoce su función. Las precursoras de encefalinas (preproencefalinas) generan, por hidrólisis sucesivas, pentapéptidos que se comportan como hormonas o neurotransmisores.

Alteraciones clínicas. No se han observado cuadros clínicos por deficiencia de adrenalina y noradrenalina; en cambio, hay una condición patológica causada por producción excesiva de esas hormonas. Es el *feocromocitoma*, tumor de células cromafines. Los pacientes afectados presentan hipertensión arterial, hiperglucemia y exageración de las actividades metabólicas promovidas por catecolaminas. Hay marcado aumento de la eliminación urinaria de ácido vanilmandélico y metanefrina.

PÁNCREAS

La función endocrina del páncreas está adscripta a los islotes de Langerhans, acúmulos de células epiteliales dispersos por todo el órgano. Estos islotes contienen diferentes tipos de células, cada uno de ellos responsable de la producción de una hormona determinada. Las células α o A, que representan de 15 a 20% del total, son las encargadas de la síntesis de *glucagón*; las células β o B (60 a 80%) elaboran *insulina*; las células δ o D (5 a 10%) secretan *somatostatina* y *gastrina* y las células PP (<2%) producen *polipéptido pancreático*. Somatostatina y polipéptido pancreático tienen acción inhibitoria sobre las otras secreciones endocrinas y exocrinas del páncreas. Existen uniones comunicantes o conexones (*gap junctions*) entre células α, β y δ. Es probable que las hormonas ejerzan acciones paracrinas que influyen el funcionamiento de células vecinas.

Insulina

La insulina es una hormona de naturaleza proteínica. Se la obtiene altamente purificada a partir de extractos de páncreas. Fue la primera proteína cuya secuencia de aminoácidos se determinó con exactitud.

La molécula está constituida por dos cadenas polipeptídicas y tiene una masa cercana a 6.000 Da. Una de las cadenas, designada A, está compuesta por 21 aminoácidos; la otra, cadena B, posee 30 aminoácidos. Ambos polipéptidos están unidos por dos puentes disulfuro extendidos desde las cisteínas en las posiciones 7 y 20 de la cadena A a las cisteínas 7 y 19 de la cadena B respectivamente. Entre dos cisteínas de la cadena A ubicadas en posiciones 6 y 11 se establece un tercer puente disulfuro intracatenario (fig. 26-15). La presencia de estas uniones disulfuro es indispensable para la actividad biológica de la hormona; su ruptura con álcalis o agentes reductores determina la pérdida de las propiedades fisiológicas de la insulina. Las estructuras terciaria y cuaternaria de la insulina son importantes en la determinación de su actividad.

La estructura descripta corresponde a una unidad molecular de la hormona. En el páncreas es frecuente encontrarla como polímeros (dímeros o hexámeros) que contienen zinc. El hexámero está compuesto por tres dímeros asociados a dos iones Zn^{2+} por enlaces de coordinación.

Existen diferencias en la estructura primaria de insulina de diferentes especies; sin embargo, todas ellas muestran la misma actividad cuando son administradas a individuos de una especie distinta. Por ejemplo, las insulinas bovina, ovina y equina difieren de la humana en tres aminoácidos. A pesar de las diferencias, esas hormonas son activas en el ser humano, propiedad que permite utilizarlas en el tratamiento de pacientes con deficiencias en la producción de insulina. Sin embargo, la administración prolongada puede desencadenar formación de anticuerpos.

La insulina porcina difiere de la humana sólo en un aminoácido; el aminoácido C-terminal (número 30) de la cadena B es alanina, mientras en la humana es treonina. Mediante procedimientos enzimáticos es posible sustituir la alanina B30 por treonina y obtener insulina "humana" semisintética a partir de la porcina. Tiene aplicación en pacientes que han desarrollado anticuerpos por tratamientos anteriores con hormona heteróloga.

La síntesis de insulina humana a partir de sus aminoácidos constituyentes fue en su momento una verdadera hazaña. En la actualidad se produce insulina humana mediante técnicas de ADN recombinante. El producto, utilizado en clínica, resuelve el problema inmunológico planteado por la utilización de insulinas heterólogas.

Biosíntesis. En el retículo endoplásmico (RE) rugoso de células β del páncreas se sintetiza *preproinsulina*, proteína precursora de 111 aminoácidos. Esta proteína penetra en la cavidad del RE e inmediatamente pierde el péptido líder, de 26 aminoácidos en el extremo N-terminal. Se forma *proinsulina*, de 85 aminoácidos y alrededor de 9.000 Da, prácticamente sin actividad hormonal. Los primeros 30 aminoácidos de esta proteína corresponden exactamente a los de la cadena B de la insulina, y los últimos 21, a los de la cadena A. Entre ambos segmentos se extiende un trozo de 34 aminoácidos, que comprende el llamado péptido C o de conexión (fig. 26-15). La disposición espacial de la proinsulina ubica las porciones de la molécula correspondientes a las cadenas A y B en la orientación adecuada para formar los puentes disulfuro.

Secreción. La proinsulina es englobada en vesículas y transportada al aparato de Golgi, donde sucesivas hidrólisis, catalizadas por peptidasas, liberan insulina activa, el péptido de conexión y dos dipéptidos ubicados en los extremos del péptido C.

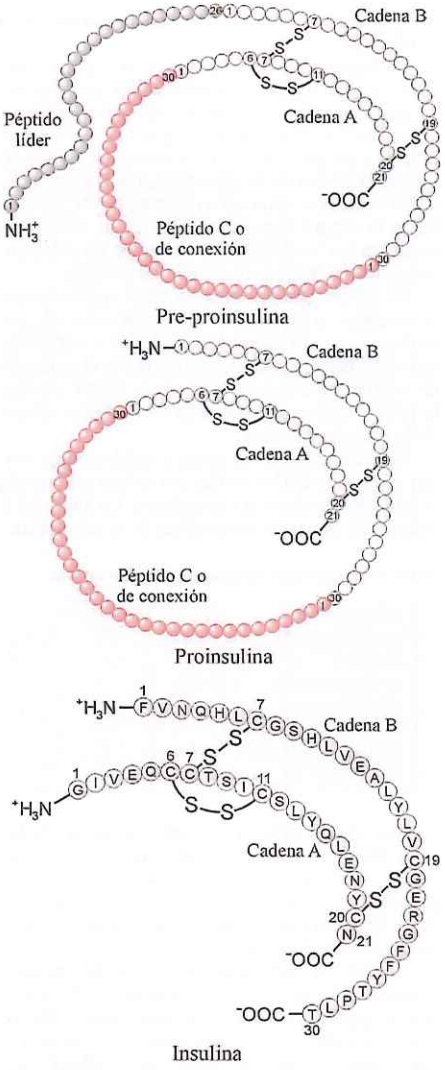


Fig. 26-15. Esquema de las moléculas de preproinsulina, proinsulina e insulina. En esta última se indican los aminoácidos constituyentes de la insulina humana.

Los segmentos separados de la proinsulina quedan dentro de las vesículas secretorias, en las cuales la insulina forma dímeros y hexámeros con zinc. La excreción del contenido de las vesículas hacia el espacio extracelular se realiza por exocitosis, desencadenada por estímulos específicos. Se liberan

cantidades equimolares de insulina y péptido C, que al parecer no desempeña función hormonal alguna. La determinación de péptido C en plasma permite conocer la cantidad de insulina endógena en pacientes tratados con hormona exógena.

Al llegar los gránulos de secreción a la sangre, los hexámeros de insulina se disocian; por esta razón, la mayor parte de la insulina en plasma se encuentra como monómeros.

El estímulo más eficaz para la síntesis y secreción de insulina es el aumento de la glucemia. La glucosa debe ser metabolizada en la célula β para estimular la secreción de insulina. La hexosa es fosforilada por acción de glucoquinasa, ingresa en las vías glucolítica y de oxidación final para producir ATP. El aumento del valor de la relación ATP/ADP promueve el cierre de canales de K^+ sensibles a adenilatos, despolariza la membrana y determina apertura de canales de Ca^{2+} accionados por voltaje. El ingreso de Ca^{2+} estimula el transporte intracelular de los gránulos y la exocitosis. Las vesículas de transporte son guiadas hacia la membrana plasmática por estructuras del citoesqueleto (microtúbulos) e impulsadas por proteínas motoras (actina y miosina).

El AMP cíclico es otro modulador de la liberación de insulina; moviliza Ca^{2+} desde las mitocondrias y eleva sus niveles en el citosol. Es de tener en cuenta que, si bien la $[Ca^{2+}]_i$ es un estímulo de la secreción, su incremento en ausencia de glucosa no produce efectos sobre la secreción de insulina.

Las sulfonilureas utilizadas en el tratamiento de algunos tipos de diabetes producen cierre de canales de K^+ en la membrana de células β y estimulan la secreción de insulina. En cambio, el diazóxido abre esos canales e inhibe la liberación de insulina.

Niveles elevados de los aminoácidos arginina y lisina y de ácidos grasos libres estimulan la secreción. Además de estos factores, la ingestión de alimentos activa la secreción de hormonas gastrointestinales (gastrina, colecistoquinina, secretina, enteroglucagón) que promueven la liberación de insulina. Por esta razón la elevación de insulina en sangre es mayor después de una comida que después de la inyección de glucosa por vía intravenosa en cantidad igual a la contenida en los alimentos ingeridos.

El glucagón es otro importante activador de la secreción. La estimulación vagal y la de receptores β-adrenérgicos promueven la secreción, mientras que la activación de receptores α-adrenérgicos la inhibe. La somatostatina deprime tanto la secreción de insulina como la de glucagón.

En condiciones basales, la concentración de insulina en sangre es de 0,4 a 0,8 ng por mL (61 pmol/L). Ocho a diez minutos después de una comida rica en hidratos de carbono, dicha concentración comienza a aumentar y alcanza un máximo a los 30 o 45 minutos. En personas normales raramente se eleva a más de 4 ng por mL (610 pg/mol/L). Los alimentos con bajo índice glucémico (pág. 283) producen menos fluctuaciones en la secreción de insulina.

Degradación. La insulina tiene una vida media menor de 10 minutos en el hombre. La hormona es degradada por *insulinasa* en hígado, riñón y otros tejidos. Aproximadamente la mitad de la insulina que atraviesa el hígado es eliminada en un solo paso.

Mecanismo de acción. La insulina actúa previa unión a receptores específicos en la membrana plasmática de las células efectoras.

Receptor de insulina. Es una glicoproteína integral de membrana, de masa aproximada a 400 kDa; pertenece a la familia de receptores de factores de crecimiento, con actividad tirosina quinasa en su porción citosólica. Es un heterotetrámero de dos subunidades α (135 kDa) y dos β (95 kDa), todas ellas glicosiladas y unidas entre sí por puentes disulfuro (figs. 25-7 B y 26-16). Las subunidades α se encuentran en el lado externo de la membrana; a ellas se une la insulina. Algunas evidencias indican que una molécula de la hormona se fija a ambas subunidades α. Las subunidades β atraviesan la doble capa lipídica y emergen a ambos lados de ésta. En su porción citosólica se encuentra el sitio activo de proteína-tirosina quinasa. Esta enzima se mantiene inactiva mientras el receptor no está ocupado; en estas condiciones la subunidad α actúa como inhibidor alostérico de la β.

Los receptores de insulina se encuentran en todos los tejidos de mamíferos. Su número varía desde 40 por célula en glóbulos rojos hasta muchos miles en hepatocitos y adipocitos.

Cuando la insulina ocupa los sitios de unión del receptor en las subunidades α, produce un cambio conformacional que se transmite a las subunidades β y activa la tirosina quinasa. El receptor activado adquiere capacidad para autofosforilarse y catalizar la fosforilación de restos tirosina de otras proteínas que contienen dominios SH2 por los cuales se unen al receptor. Las mejor caracterizadas de estas proteínas son los *sustratos del receptor de insulina (IRS)*, de los cuales se han identificado cuatro. IRS-1 e IRS-2 están distribuidos en la mayoría de tejidos, especialmente hígado y músculo. Se han encontrado IRS-3 en adipocitos, fibroblastos y hepatocitos e IRS-4 en riñón embrionario. Se conocen al menos otras cinco proteínas que se unen al receptor activado por insulina que, se supone, podrían actuar como intermediarias en sistemas de señales.

La actividad de tirosina quinasa del receptor inducida por la unión de insulina inicia una cascada de fosforilaciones. Las proteínas sustrato del receptor de insulina se convierten, por fosforilación, en centros de emisión de señales multifuncionales. Las fosfotirosinas de IRS fijan otras proteínas poseedoras de dominios SH2, entre ellas fosfoinositol-3-quinasa (PI3K) y Grb-2. La figura 26-16 presenta algunos de los sistemas de señales activados por insulina.

Una de las principales vías de señales puestas en marcha a partir del complejo insulina-receptor es la que comprende a la fosfoinositol-3-quinasa.

La PI3K activada por su interacción con la proteína IRS cataliza la adición de un resto fosfato en la posición 3 del inositol de inositol-4,5-bisfosfato (PI-4,5-P_2) para formar inositol-3,4,5-trisfosfato (I-3,4,5-P_3). Este compuesto atrae proteínas que contienen dominios PH (de *plekstrin homology*). La unión de estas proteínas a I-3,4,5-P_3 las activa. Una de las más importantes enzimas estimuladas por esta vía es la *proteína quinasa B* (PKB), serina-treonina quinasa, designada también con las siglas Akt por su relación con el oncogén retroviral *v-Akt*.

La PKB o Akt activada fosforila diversas proteínas efectoras; esta acción promueve modificaciones de la actividad de enzimas o de la expresión génica. Algunas de las acciones mediadas por esta vía son:

Activación del transporte de glucosa. Las evidencias disponibles indican que fosforilaciones catalizadas por la Akt/PKB son el factor principal determinante de la translocación de transportadores GLUT4 desde vesículas intracelulares hacia la membrana plasmática, incrementando así la captación de glucosa. Esta acción es particularmente notable en músculo y adipocitos.

En músculo esquelético el ingreso de glucosa puede ser, además, estimulado por la contracción o la hipoxia, que activan la AMP quinasa (AMPK); ésta promueve la translocación de GLUT4 a la membrana independientemente de insulina. En esta observación se basa la indicación de actividad física en pacientes diabéticos.

Síntesis de glucógeno. Akt/PKB deprime la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) y estimula la proteína fosfatasa 1 (ver págs. 381 a 382), lo cual ayuda a mantener desfosforilada, es decir activa, a la GS.

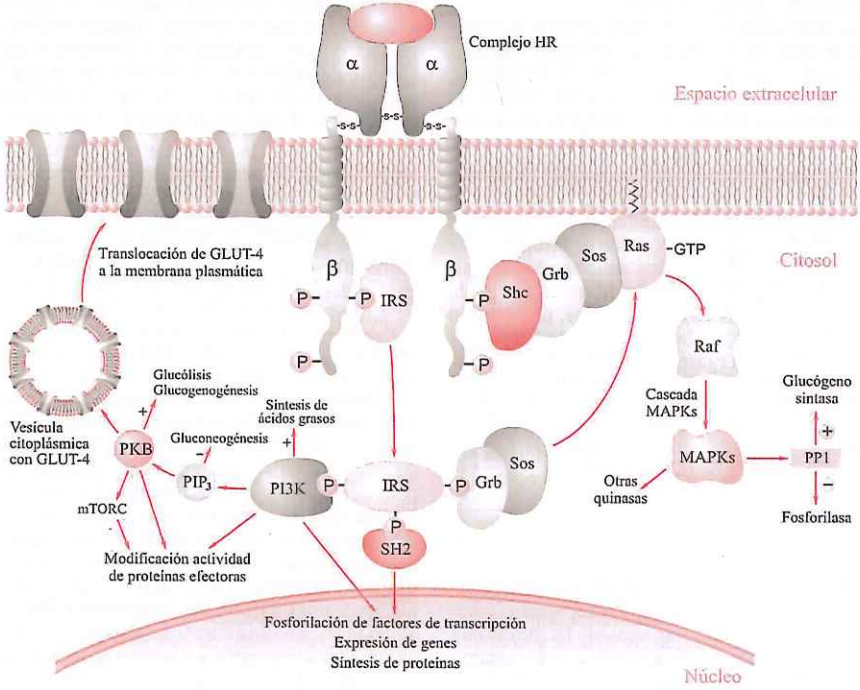


Fig. 26-16. Sistemas de transducción de señales activados por insulina.

Glucólisis. La PKB activa a la fosfofructoquinasa 2, enzima que cataliza la formación de fructosa-2,6-bisfosfato (F-2,6-bisP) a partir de fructosa-6-P. La F-2,6-bisP es un poderoso efector positivo de la fosfofructoquinasa 1, importante enzima regulatoria de la vía glucolítica.

Gluconeogénesis. El PI-(3,4,5)-P_3 inhibe la glucosa-6-fosfatasa

Conversión de glucosa en ácidos grasos. La inactivación de GSK3 por Akt/PKB mantiene activa a la ATP-citrato liasa, lo que estimula la conversión de glucosa en ácidos grasos. Además, la insulina, a través de la vía de PI3K favorece la síntesis de ácidos grasos por activación de piruvato deshidrogenasa y de acetil-CoA carboxilasa, y la producción y secreción de VLDL.

Acciones sobre la actividad génica mediadas por la vía de PI3K. a) Inducción de la expresión de hexoquinasa en músculo, b) represión de la transcripción del gen que codifica para fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, y c) activación de la síntesis de glucosa-6-P deshidrogenasa, enzima de la vía de pentosa fosfato.

Metabolismo de triacilgliceroles. La insulina tiene efecto antilipolítico pues inhibe la lipasa sensible a hormonas en tejido adiposo por activación de la fosfodiesterasa que hidroliza AMPc. La fosfodiesterasa es una de las proteínas "blanco" de la PKB.

Aumenta la actividad de la lipoproteína lipasa en el endotelio vascular, especialmente de tejido adiposo. Esta enzima cataliza la hidrólisis de triacilgliceroles de las lipoproteínas del plasma y aumenta la oferta de "materia prima" para la síntesis de grasas en adipocitos. A esto también contribuye el mayor ingreso y degradación de glucosa, con lo que hay mayor disponibilidad de glicerol-3-fosfato.

Síntesis de proteínas. El sistema de señales IRS-PI3K participa en la regulación del transporte de aminoácidos, transcripción de genes y traducción de ARNm. Los efectos rápidos de la insulina y factores de crecimiento en la síntesis de proteínas son en gran parte mediados por aumento de la actividad de traducción de ARNm preexistente. Esto se logra por regulación de componentes de los complejos de iniciación y elongación que participan en la traducción de ARNm. La PKB activa los factores de iniciación FIe2b y FIe4E.

Además del sistema de señales IRS-PI3K-PI-(3,4,5)-P_3-PKB, la insulina puede activar otras vías, por ejemplo las vías mitogénicas. IRS fosforilado interactúa con dominios SH2 en proteínas Grb-2 y desde éstas a Sos para activar la cascada Ras-MAP quinasas. A través de esta vía se estimulan *fosfatasas* que modulan numerosas enzimas y otras proteínas y se activan factores de transcripción que estimulan la proliferación y diferenciación celular.

Estas acciones están también relacionadas con la activación, a través de la vía PI3K-PKB (AKT), de la señalización por mTORC1 y mTORC2.

Se ha propuesto que los efectos de la insulina sobre la gluconeogénesis y el metabolismo lipídico serían debidas, en parte, a su efecto sobre el *receptor α activado por el proliferador de peroxisomas* (PPARα) (pág. 488).

Se han descripto otras interacciones, a partir de IRS, con fosfolipasa Cγ (PLCγ) y PKC. La multiplicidad de vías de señales activadas por la insulina y sus frecuentes conexiones es un ejemplo de las interrelaciones que los autores ingleses denominan *crosstalk*.

La transducción de señales iniciada por la insulina puede ser deprimida por varios reguladores. La autofosforilación del receptor de insulina es revertida por una proteína tirosina fosfatasa 1B también llamada PTPN1.

El complejo insulina-receptor es internalizado por endocitosis. Frecuentemente, después de la disociación del complejo HR en el citosol, el receptor es devuelto a la membrana externa y la insulina degradada en lisosomas. A veces el receptor también es hidrolizado por proteasas lisosomales, como mecanismo de regulación depresora (*down regulation*).

Acciones metabólicas

Las acciones de la insulina abarcan diversas áreas del metabolismo y ponen en juego variados mecanismos fisiológicos: modificación de la actividad de sistemas de transporte de membrana, regulación de la síntesis de ARN y proteínas y modulación de la actividad de enzimas. Esta multiplicidad de respuestas hace difícil establecer si un efecto determinado resulta de la acción directa o primaria de la hormona, o es secundario a las modificaciones producidas a otro nivel. Los cambios metabólicos promovidos por la hormona en un tejido pueden provocar modificaciones en la provisión de sustratos o efectores alostéricos, que a su vez influyen el funcionamiento de otras enzimas.

Los principales tejidos efectores de la acción de insulina son: muscular, adiposo y hepático.

1. **Efectos sobre transporte de metabolitos.** En los tejidos muscular y adiposo, la hormona estimula el ingreso de glucosa, aminoácidos, nucleósidos y fosfato en las células.

En las células de mamíferos existen transportadores responsables de la difusión facilitada de glucosa (ver págs. 207 y 257). De los distintos tipos de transportadores, GLUT1 y GLUT3 se encuentran ampliamente distribuidos; aseguran el abastecimiento de glucosa a las células aun con bajos niveles en sangre. GLUT4, presente en músculo y tejido adiposo, es el único regulado por insulina. En condiciones basales, con concentraciones 5 mM de glucosa o más bajas, sólo se encuentran transportadores GLUT1 en las membranas de miocitos y adipocitos. La mayoría de los transportadores GLUT4 están insertos en membranas de vesículas intracelulares.

El aumento de glucosa estimula la liberación de insulina, la cual pone en marcha, a través de sus receptores, sistemas de señales (IRS-PI3K) que promueven el rápido traslado de GLUT4 desde el interior de la célula hacia la membrana plasmática y con ello aumenta marcadamente la captación de glucosa.

Cuando la concentración extracelular de glucosa e insulina descienden, los transportadores GLUT4 son internalizados por endocitosis. El "reciclado" de transportadores controlado por insulina regula el ingreso de glucosa a los tejidos muscular y adiposo según las necesidades.

2. **Efectos sobre el metabolismo de carbohidratos.** La insulina es la principal hormona hipoglucemiante. Esta acción se debe a su capacidad de estimular el ingreso de glucosa en los tejidos por transportadores sensibles a la hormona y de activar la utilización de glucosa en los tejidos.

Hígado. La insulina influye notablemente sobre las funciones glucorreguladoras del hígado. Aumenta la actividad de glucoquinasa y canaliza la glucosa hacia todas las vías de utilización. Se estimulan glucogenogénesis, glucólisis, oxidación total de glucosa, vía pentosa fosfato, conversión de glucosa en lípidos. Estos efectos se deben no sólo a modulación directa de la actividad de enzimas como glucógeno sintasa y piruvato deshidrogenasa, sino también a inducción de la síntesis de otras enzimas de las vías citadas. Por este mecanismo se incrementa la actividad de enzimas glucolíticas (glucoquinasa, fosfofructoquinasa y piruvatoquinasa). Estas acciones se acompañan de la depresión de la glucogenólisis y gluconeogénesis, alcanzadas por desactivación directa de fosforilasa quinasa y glucógeno fosforilasa y represión de la síntesis de piruvato carboxilasa, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa y glucosa-6-fosfatasa.

Músculo y tejido adiposo. La insulina estimula directamente el ingreso de glucosa en músculos esquelético y cardíaco y en adipocitos (translocación de GLUT4). En músculo favorece la utilización de glucosa o su depósito como glucógeno.

3. **Efectos sobre metabolismo de lípidos.** La insulina estimula la síntesis de ácidos grasos y triacilgliceroles en hígado, tejido adiposo, glándula mamaria lactante y otros tejidos.

La activación de la glucólisis, degradación oxidativa de glucosa y vía de las pentosas aumentan la producción de acetil-CoA y NADPH, utilizables para la biosíntesis de ácidos grasos. Además, se genera más glicerofosfato, metabolito precursor de triacilgliceroles. La lipogénesis es también favorecida porque la insulina activa piruvato deshidrogenasa, acetil-CoA carboxilasa y glicerofosfato aciltransferasa. Cuando hay aporte de alimentos en exceso, la insulina dirige el acetil-CoA preferentemente hacia la síntesis de ácidos grasos.

La insulina activa la lipoproteína lipasa unida a membrana de capilares periféricos, lo cual aumenta la provisión de ácidos grasos a los tejidos (preferentemente adiposo) para la síntesis de triacilgliceroles. Por otro lado, la hormona inhibe la lipasa de adipocitos, lo cual deprime la lipólisis y reduce el nivel de ácidos grasos libres circulantes. También reduce la cetogénesis.

4. **Efectos sobre metabolismo de proteínas.** La insulina estimula la captación de aminoácidos por las células y su incorporación a proteínas, y activa los procesos de transcripción y traducción. Los efectos anabólicos de la hormona se expresan por disminución de la urea producida en hígado. La Tabla 26-6 resume las acciones metabólicas de la insulina.

5. **Efectos sobre potasio.** La insulina aumenta la actividad de Na^+,K^+-ATPasa e incrementa el potencial transmembrana. Cuando hay deficiencia de hormona, el potasio escapa hacia el compartimiento extracelular y es eliminado por vía renal.

Tabla 26-6. Acciones metabólicas de la insulina.

↑ Captación de glucosa por los tejidos periféricos
↑ Actividad de todas la vías de consumo de glucosa
↑ Glucólisis
↑ Vía de las pentosas
↑ Oxidación total de la glucosa
↑ Glucogenogénesis
↓ Glucogenólisis
↓ Gluconeogénesis
↓ Glucemia
↓ Lipólisis
↓ Ácidos grasos libres en el plasma
↑ Lipogénesis a partir de la glucosa
↑ Captación de aminoácidos en los tejidos
↑ Síntesis de proteínas
↓ Producción de urea

Acciones paracrinas. Además de sus efectos a distancia o endocrinos, la insulina cumple acciones paracrinas. Junto con la somatostatina de las células δ del páncreas (pág. 544) inhibe la secreción de glucagón en las células α vecinas.

Uno de los estímulos más poderosos para la liberación de insulina y somatostatina en las células β y δ respectivamente es el aumento de la glucemia. Por otro lado, el incremento de aminoácidos libres activa la secreción de glucagón (algunos aminoácidos también estimulan la de insulina). Los efectos de los alimentos sobre la liberación de estas hormonas depende de la relación entre sus contenidos de hidratos de carbono y proteínas. Un alimento rico en carbohidratos deprimirá la producción de glucagón. En cambio, si es abundante en proteínas y pobre en glúcidos, la estimulará.

Cuadros clínicos

Hipofunción. La deficiencia absoluta o relativa de insulina produce un cuadro clínico muy común, denominado *diabetes mellitus*, que consideraremos más adelante.

Hiperfunción. Existen tumores funcionantes de células β que producen insulina en exceso. Los pacientes sufren crisis de hipoglucemia, con sensación de debilidad, sudoración profusa, lipotimia. Si el cuadro no es tratado con aporte de glucosa, se puede llegar al shock hipoglucémico, con pérdida de conciencia, convulsiones, coma y muerte. Los mismos síntomas se presentan como consecuencia de la administración de dosis elevadas de insulina.

Glucagón

El glucagón es producido en las células α o A de los islotes de Langerhans del páncreas. Es un polipéptido de 29 aminoácidos en cadena lineal, de masa próxima a 3.500 Da. A diferencia de la insulina, no contiene cisteína y posee metionina y triptófano, aminoácidos ausentes en aquella hormona. Originalmente se sintetiza una molécula precursora de mayor tamaño, el *preproglucagón*, que se convierte en *proglucagón* y *glucagón* por hidrólisis sucesivas. A partir de proglucagón, de 160 aminoácidos, se producen *péptido relacionado con glicentina* y *péptidos tipo glucagón 1* y *2* (GLP-1 y GLP-2, de *glucagon-like peptide)*. La *glicentina* es un polipéptido de 69 aminoácidos formado por unión del péptido relacionado y glucagón. Se produce en intestino en mayor proporción que en el páncreas, razón por la cual se lo llama también *enteroglucagón*. Al GLP-1 se le separa un trozo de seis aminoácidos para dar *incretina*. Secretada en intestino, es estimulante de la secreción de insulina potenciando la acción de la glucosa.

La concentración de glucagón inmunorreactivo en plasma, en condiciones de ayuno, es de 75 pg por mL (25 pmol/L). Sólo 35% es glucagón pancreático; el resto corresponde a otras moléculas derivadas o secretadas en intestino.

El glucagón circula libre en plasma y tiene una vida media breve (unos 6 minutos).

El principal regulador de la secreción es el nivel de glucosa en sangre. El aumento de la glucemia inhibe la secreción de glucagón, mientras que la hipoglucemia la activa.

No hay certeza acerca del mecanismo de acción de la concentración de glucosa en sangre sobre la secreción de glucagón. Se ha propuesto que no actúa directamente sino por intermedio de insulina y somatostatina pancreática, liberadas en respuesta a la hiperglucemia. Estas hormonas ejercen acción paracrina inhibitoria sobre las células α.

El incremento de aminoácidos en plasma, especialmente arginina y alanina, la estimulación del sistema nervioso simpático, catecolaminas, hormonas gastrointestinales y glucocorticoides activan la secreción. Altos niveles de ácidos grasos la inhiben.

La leucina, que promueve liberación de insulina, no influye sobre la de glucagón.

Mecanismo de acción. El glucagón se une a receptores específicos de membranas de hepatocitos y tejido adiposo, acoplados a proteínas G_s, que activan la adenilato ciclasa, aumentan la concentración de AMP cíclico e inician la cascada de fosforilaciones que modifican la actividad de varias enzimas.

Acciones. El glucagón promueve la provisión de sustratos proveedores de energía a los tejidos en los intervalos que median entre comidas, cuando no hay ingreso de nutrientes por intestino.

Efectos sobre el metabolismo de hidratos de carbono. En hepatocitos, el glucagón, a través del aumento de AMP cíclico y proteína quinasa A activa a la glucógeno fosforilasa e inhibe a la glucógeno sintasa. Se promueve la glucogenólisis, con formación y liberación de glucosa hacia el espacio extracelular, y se reprime la glucogenogénesis.

Si bien el glucagón actúa en el mismo sentido que la adrenalina, es activo en hígado y no afecta al tejido muscular, en el cual predomina la acción de la adrenalina. Sin embargo, el glucagón aumenta los ácidos grasos libres del plasma, que a su vez deprimen la captación de glucosa por el músculo.

El efecto hiperglucemiante del glucagón es reforzado por su capacidad para incrementar la gluconeogénesis.

2. **Efectos sobre el metabolismo de los lípidos.** En tejido adiposo, el glucagón aumenta la

concentración de AMPc, lo cual activa la lipasa sensible a hormonas. Se estimula la degradación de triacilgliceroles y la liberación de ácidos grasos hacia la sangre. Aumenta la β-oxidación de ácidos grasos, lo que reduce los niveles de NAD en la célula y disminuye la capacidad de oxidar glucosa en el ciclo del ácido cítrico. La concentración de acetil-CoA aumenta, así como la formación de cuerpos cetónicos.

3. **Efectos sobre el metabolismo nitrogenado.** El glucagón estimula el catabolismo nitrogenado; aumenta la eliminación urinaria de urea, creatinina y ácido úrico. Favorece un balance nitrogenado negativo. Activa la gluconeogénesis a partir de aminoácidos. La Tabla 26-7 resume las acciones del glucagón.

Tabla 26-7. Acciones metabólicas del glucagón.

En hígado
↑ Glucogenólisis
↓ Glucogenogénesis
↑ Gluconeogénesis
↑ Glucemia
↑ Urea, creatinina, ácido úrico
En tejido adiposo
↑ Lipólisis
↑ Ácidos grasos libres en plasma

Somatostatina

La *somatostatina*, descripta como hormona del hipotálamo (pág. 513), es producida también por células δ de los islotes de Langerhans en páncreas, por enterocitos y células C (parafoliculares) de tiroides.

Procesamientos alternativos del extremo C-terminal de la preprosomatostatina, precursor de 116 aminoácidos, generan un tetradecapéptido, la somatostatina 14 u otro péptido de igual secuencia inicial pero el doble de extenso, la somatostatina 28. Ambas ejercen acciones similares. La somatostatina 14 predomina en hipotálamo y páncreas y la 28, en intestino. Ambas formas se unen a los mismos receptores, acoplados a proteínas G_i. La disminución de AMP cíclico y de Ca^{2+} intracelular que provocan son los mecanismos más eficaces para inhibir la secreción de hormonas. También tiene efectos sobre fosfotirosina fosfatasa y MAP quinasas, a los que se deberían las acciones antiproliferativas de somatostatina sobre células tumorales.

Casi todos los estimulantes de la secreción de insulina también producen liberación de somatostatina en páncreas.

Además de su notable efecto inhibitorio sobre la secreción de hormona de crecimiento en hipófisis, la somatostatina deprime las de insulina, glucagón, gastrina, secretina y VIP. Afecta también a las células tirotrofas de hipófisis aumentando la acción inhibitoria (retroalimentación) de las hormonas tiroideas. Disminuye la absorción de nutrientes en el intestino.

Homeostasis de la glucemia

Regulación hormonal de la glucemia. La concentración de glucosa en sangre es sostenida dentro de niveles estables (entre 70 y 110 mg por dL o 3,9 y 6,1 mM) gracias a un eficaz sistema regulatorio integrado por un conjunto de hormonas. Como se ha indicado anteriormente (pág. 282), existe un delicado balance entre las acciones tendientes a disminuir el nivel de glucosa circulante y las que procuran elevarlo.

Son procesos *hipoglucemiantes*:

a) facilitación del ingreso de glucosa en las células; b) estimulación de la glucogenogénesis; c) estimulación de las vías de degradación de glucosa (glucólisis, vía de pentosa fosfato); d) conversión de glucosa en otro tipo de sustancias, principalmente grasas.

Son procesos *hiperglucemiantes*:

a) glucogenólisis hepática; b) gluconeogénesis; c) absorción de glucosa en intestino.

La *insulina* es el principal factor hipoglucemiante. Todos los procesos que operan en ese sentido son activados por esta hormona.

Tienen acción hiperglucemiante:

Glucagón. Entre otras acciones, activa la glucogenólisis hepática y la gluconeogénesis.

Adrenalina. Activa la glucogenólisis muscular y hepática. Sólo en hígado se libera glucosa en cantidades significativas para aumentar la glucemia. En músculo la degradación prosigue hasta lactato, el cual es reconvertido en glucosa por el hígado.

Glucocorticoides (*cortisol*). Aumentan la gluconeogénesis en hígado e inhiben la utilización de glucosa en tejidos extrahepáticos.

Hormona de crecimiento. Disminuye el ingreso de glucosa en músculo y la utilización de glucosa en general.

Normalmente, el juego de estos factores está perfectamente ajustado y mantiene los niveles de glucosa circulante en ayunas dentro de valores constantes. Esto es particularmente importante, pues asegura el suministro permanente de combustible a tejidos absolutamente dependientes del aporte sanguíneo de glucosa, como el sistema nervioso central.

Diabetes mellitus

La diabetes mellitus es una condición patológica caracterizada por hiperglucemia y glucosuria persistentes, además de un complejo de síntomas resultante de un serio desequilibrio metabólico general. Sus síntomas más llamativos son: *Hiperglucemia,* refleja la reducción de los valores de la relación insulina/glucagón. Cuando la glucemia excede de 160 mg por dL aparece *glucosuria*. *Poliuria*, eliminación aumentada de orina. *Polidipsia*, aumento de la sed e ingesta de agua, resultado de la deshidratación provocada por la diuresis osmótica. *Polifagia*, apetito aumentado.

La diabetes puede ser causada por deficiencia absoluta de insulina (incapacidad para sintetizar la hormona), como en la forma clínica *dependiente de insulina* o *tipo 1*; a ésta pertenece la llamada *diabetes juvenil*. Existe otra forma, *no insulinodependiente* o *tipo 2*, que se manifiesta en personas adultas, en la cual la producción de insulina puede estar reducida, normal, o incluso aumentada. Hay resistencia de los tejidos efectores a la insulina.

Diabetes tipo 1. Se presenta en menos del 10% del total de pacientes diabéticos. Se hace evidente entre los 10 y 14 años de vida. Es la forma más severa, en la cual se manifiestan todos los trastornos de la falta de insulina. Debe ser tratada con administración de la hormona por vía parenteral. Es una enfermedad autoinmune; el paciente produce anticuerpos contra sus propias células β, que van siendo eliminadas hasta su completa desaparición. En pacientes con diabetes tipo 1, se ha observado asociación significativa entre esta condición patológica y los complejos mayores de histocompatibilidad (HLA) tipos DR3 y DR4 (pág. 681).

Recientemente se han identificado mutaciones en el gen que codifica insulina. La hormona sintetizada es inactiva; se produce diabetes mellitus desde el nacimiento.

Alteraciones metabólicas. Hay hiperglucemia en ayunas debida a aumento de la gluconeogénesis en hígado. La captación de glucosa por los tejidos es normal en estado basal, pero después de ingerir glucosa se observa aumento exagerado de la glucemia porque está disminuido su ingreso a los tejidos periféricos y el almacenamiento como glucógeno, al tiempo que no se suprime la liberación de glucosa desde el hígado. El flujo de metabolitos a través del ciclo del ácido cítrico está deprimido por reducción de la concentración de sus intermediarios. Buena parte del oxaloacetato es desviada hacia la gluconeogénesis. La síntesis de glucógeno disminuye en todos los tejidos. A ello contribuyen la inactivación de glucógeno sintasa y la escasa producción de ATP (la carga energética de las células es baja).

El incremento de glucemia por encima del umbral renal produce *glucosuria*. La eliminación de glucosa por orina necesariamente es acompañada por la cantidad correspondiente de solvente (agua), lo que explica la poliuria y la tendencia a la deshidratración.

Aumenta la actividad lipolítica; incrementa la concentración de ácidos grasos no esterificados en sangre. Disminuye la formación de malonil-CoA, primera etapa de la síntesis de ácidos grasos. El malonil-CoA es inhibidor competitivo de carnitina-aciltransferasa I. Cuando el malonil-CoA se reduce, la actividad de carnitina-aciltransferasa I aumenta; los ácidos grasos acceden en mayor proporción a las enzimas de la β-oxidación en matriz mitocondrial y alimentan la cetogénesis. La producción de cuerpos cetónicos es más rápida que su metabolización y aumentan en los líquidos corporales no sólo por el déficit de insulina, sino también por exceso de hormonas antagónicas, especialmente glucagón. La reducción del pH sanguíneo (cetoacidosis diabética) por los niveles elevados de cuerpos cetónicos es frecuente en pacientes mal controlados. Los cuerpos cetónicos acetoacetato y β-OH-butirato en exceso contribuyen a la diuresis osmótica y a la deshidratación.

Se reduce el transporte y utilización de aminoácidos, lo cual determina elevación de la concentración de aminoácidos libres en sangre. Se incrementa la producción de urea y se reduce la síntesis de proteínas. Predomina el catabolismo proteico y el balance nitrogenado se hace negativo. Aumenta la utilización de esqueletos carbonados de aminoácidos para síntesis de glucosa (gluconeogénesis).

Sale potasio de las células y hay excreción aumentada de este catión por orina. La glucosuria y cetonuria incrementan la diuresis, con la consiguiente pérdida obligada de agua y electrólitos.

Diabetes tipo 2. Comprende entre el 80 y 90% del total de casos de diabetes. En general se presenta en personas de más de 40 años, en su mayoría con algún grado de obesidad.

Hay predisposición genética, de carácter poligénico, que es agravada por factores como dieta no balanceada o excesiva, vida sedentaria, obesidad abdominal y visceral y envejecimiento.

Los pacientes con diabetes tipo 2 no tienen inicialmente déficit en la producción de insulina, que incluso suele estar aumentada, sino insuficiencia relativa de la hormona.

El cuadro primario es una alteración de la respuesta de células β del páncreas a las variaciones

de la glucemia y fallas en el ingreso de glucosa en músculo y tejido adiposo. Ambos defectos tienden a producir hiperglucemia y pueden determinar aumento en la secreción de insulina, en un intento de compensar la resistencia de los tejidos periféricos a la hormona. La exposición prolongada a altos niveles de glucosa va produciendo mayor desensibilización de las células β y declinación progresiva de sus funciones. El estrés producido por las alteraciones metabólicas deteriora progresivamente el funcionalismo de las células β; se va reduciendo su capacidad de síntesis y secreción de insulina y finalmente se llega a su muerte apoptótica (Cap. 32).

Estos pacientes presentan muy pobre respuesta de las células a la insulina (falta de sensibilidad o resistencia a la insulina). La resistencia a la insulina puede deberse a diversos factores, entre ellos desfosforilación de sustratos del receptor de insulina, defectos en las proteínas blanco de Akt/PKB o pérdida de sustratos del receptor de insulina

Alteraciones metabólicas. La captación posprandial de glucosa dependiente de insulina está disminuida, particularmente en músculo esquelético. El transporte, la utilización de glucosa y la formación de glucógeno están disminuidos.

Los ácidos grasos no esterificados y los cuerpos cetónicos están ligeramente elevados en plasma. No hay gran tendencia a la cetosis. El metabolismo proteico es normal.

La Tabla 26-8 presenta las alteraciones metabólicas más importantes en la diabetes mellitus.

Tabla 26-8. Alteraciones metabólicas en la diabetes mellitus.

↓ Captación de glucosa por los tejidos periféricos
↓ Utilización de la glucosa en los tejidos periféricos
↑ Glucogenólisis hepática
↑ Gluconeogénesis hepática
↓ Glucogenogénesis
↑ Glucemia
↑ Lipólisis en el tejido adiposo
↓ Lipogénesis en el tejido adiposo
↑ β-oxidación de los ácidos grasos
↑ Ácidos grasos libres en el plasma
↑ Producción de cuerpos cetónicos Cetonemia-Cetonuria-Cetoacidosis
↑ Síntesis de acilgliceroles y VLDL en el hígado
↑ Lipidemia
↑ Catabolismo proteico
↑ Aminoácidos libres
↑ Formación de urea
La carga de glucosa filtrada en los glomérulos excede la capacidad de reabsorción de los túbulos renales: glucosuria.
Pérdida de agua y sodio por diuresis osmótica: Poliuria-Hipovolemia-Hiperosmolaridad.

El tratamiento de la diabetes permite controlar muchas de las alteraciones metabólicas mencionadas. Sin embargo, no previene la aparición de daños en sistema nervioso, riñón, retina, arterias y capilares; sólo los retarda. Una de las causas de alteraciones tisulares es la glicosilación no enzimática de proteínas.

Resistencia a la insulina. Frecuentemente es la consecuencia de la sobrecarga alimentaria que suele acompañar a la obesidad. El depósito de grasas en exceso en órganos y tejidos fuera del tejido adiposo, la acumulación de productos de la metabolización incompleta de nutrientes, junto a cambios en captación de ácidos grasos, factores hormonales e inflamatorios, pueden favorecer la acumulación de metabolitos lipídicos (diacilgliceroles y ceramidas) en hígado y músculo, alteración de transducción de señales dependientes de insulina, resistencia a la insulina y eventualmente diabetes tipo 2.

Funciones endocrinas del tejido adiposo. Los adipocitos tienen un papel regulatorio en el desarrollo de la resistencia a la insulina. Producen hormonas como *leptina* (pág. 316), *adiponectina*, *resistina* y citoquinas inflamatorias, principalmente *interleuquina 6* (IL6) y *factor de necrosis tumoral* α (TNFα).

Leptina y adiponectina tienen acción antidiabetógena por su capacidad de disminuir la síntesis de triacilglicéridos, de estimular la β-oxidación de ácidos grasos y de favorecer la acción de la insulina en hígado y músculo esquelético. Ambas hormonas actúan estimulando la quinasa activada por AMP (AMPK).

La AMPK es un factor clave en la regulación del balance energético; responde a la reducción de ATP o aumento de la relación AMP/ATP en los tejidos activando la oxidación de glucosa y ácidos grasos.

En personas obesas, los niveles de leptina aumentan, pero los tejidos no responden a ella, mientras los niveles de adiponectina disminuyen. Se incrementa la producción de citoquinas proinflamatorias, que promueven el reclutamiento de macrófagos hacia los tejidos y el daño celular.

Efectos de la sobrecarga dietaria. En hígado, la sobrealimentación crónica aumenta los niveles de malonil-CoA, lo que promueve la síntesis de ácidos grasos e inhibe la carnitina-acil transferasa I. Los ácidos grasos no pueden ser oxidados en mitocondrias, se reduce el funcionamiento del ciclo del ácido cítrico y de la cadena de transporte electrónico.

La hipernutrición impone una sobrecarga anabólica en el retículo endoplásmico (RE), que puede sufrir alteraciones con variadas consecuencias, entre ellas mal plegamiento de proteínas.

El estrés metabólico induce la expresión de proteína serina-quinasas que bloquean la acción inhibitoria de la insulina sobre la gluconeogénesis. El hígado continúa produciendo y liberando glucosa a la circulación.

En músculo esquelético, el ingreso aumentado de ácidos grasos y la estimulación del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PPARα/δ) promueven la β-oxidación, pero no hay coordinación con el funcionamiento del ciclo del ácido cítrico. En consecuencia, se acumulan en mitocondrias productos de la oxidación incompleta de ácidos grasos (acil-carnitina, especies reactivas de oxígeno). El estrés subsiguiente activa serina-quinasas que anulan la transducción de señales iniciadas por insulina e impiden el traslado de las vesículas que contienen GLUT4 y la inserción de éstos en la membrana plasmática.

El ejercicio o actividad física contrarresta el estrés lipídico, activa la vía de PPARα/β, coordina las vías oxidativas y el funcionamiento de las mitocondrias. Se restablece la sensibilidad a la insulina.

Síndrome metabólico. El cuadro denominado *síndrome metabólico* se caracteriza por la presencia simultánea de: obesidad abdominal (aumento de la circunferencia de la cintura), resistencia a la insulina, con la consiguiente perturbación de la homeostasis de glucosa e hiperglucemia, hiperinsulinemia, dislipidemia, trastornos en la eliminación de trombos intravasculares (por inhibición de la fibrinólisis), hipertensión arterial y microalbuminuria. El aumento excesivo de insulina incrementa la retención de sodio en los túbulos renales, contribuyendo a la hipertensión. La dislipidemia tiene el perfil aterogénico, con niveles elevados de VLDL y LDL (hipertriacilgliceridemia e hipercolesterolemia) y reducción de HDL. La convergencia de estos factores es causa frecuente de enfermedad coronaria y accidentes cerebrovasculares.

El síndrome metabólico es una condición prevalente en gran parte del mundo y puede alcanzar al 40% de los adultos mayores de 60 años. Los individuos afectados tienen muy aumentado el riesgo de padecer diabetes tipo 2 y de sufrir accidentes cardiovasculares.

Prueba de tolerancia a la glucosa. Ha sido utilizada para la detección precoz de diabetes. El individuo en ayuno de unas diez horas recibe por vía oral una dosis de glucosa de un gramo por kg de peso corporal. Se extraen muestras de sangre cada media hora desde el comienzo de la prueba (tiempo 0) hasta 2 a 4 horas después. Las personas normales tienen una glucemia en ayunas menor de 110 mg/dL; el valor máximo, que no excede de 200 mg/dL, se alcanza de media a una hora después de la ingesta de glucosa. A las dos horas, la glucemia está por debajo de 140 mg/dL. En diabéticos, el nivel de ayunas excede 140 mg/dL y al menos dos de las determinaciones dan valores superiores a 200 mg/dL. La elevación de la glucemia se sostiene durante un tiempo más prolongado que el normal (fig. 26-17).

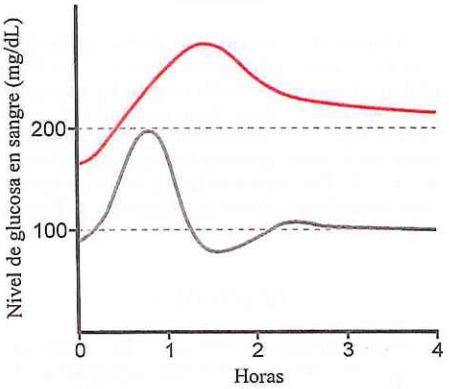


Fig. 26-17. Curva de tolerancia a la glucosa. En gris se representa la curva normal; en rojo, la respuesta de un paciente diabético.

Diabetes experimental. Puede ser producida por pancreatectomía total o por administración parenteral de drogas como la estreptozotocina o el aloxano, sustancia derivada de pirimidina. Estos compuestos producen diabetes permanente en animales de laboratorio por lesión química selectiva de las células β de los islotes de Langerhans.

Hipoglucemiantes orales. Se han desarrollado fármacos que, administrados por vía oral, actúan reduciendo los niveles de glucosa en sangre. Entre éstos se encuentran las sulfonilureas, sustancias que estimulan la secreción de insulina almacenada en las células β del páncreas. Obviamente, sólo son eficaces cuando hay producción de insulina. Las biguanidas son hipoglucemiantes que actúan aun en ausencia de insulina. Producen aumento del ingreso de glucosa en las células y deprimen la gluconeogénesis.

Las *tiazolidinadionas* son agonistas del receptor nuclear PPARγ; mejoran la sensibilidad de los tejidos a la insulina probablemente activando, a través de las vías de leptina y adiponectina, la quinasa dependiente de AMP (AMPK).

Los compuestos mencionados son de utilidad en el tratamiento de diabetes tipo 2.

GÓNADAS

Además de producir las células germinales (óvulos y espermatozoides), ovario y testículo elaboran hormonas esenciales para las funciones de reproducción. Estas hormonas son esteroides cuya acción: a) Promueve el desarrollo de los órganos del aparato reproductor y sus glándulas accesorias. b) Determina el desarrollo de los caracteres secundarios típicos de cada sexo. c) Regula la producción de los ciclos sexuales en la mujer.

TESTÍCULO

En los extractos de testículo se han aislado diversos esteroides con actividad androgénica (fig. 26-18). La principal hormona producida en testículo es la *testosterona*, sintetizada en mitocondrias de células intersticiales o de Leydig. Además de testosterona, el testículo secreta un andrógeno más potente, *dihidrotestosterona* y otros más débiles, *deshidroepiandrosterona* y *androstenediona*. En las células de Leydig se producen también pequeñas cantidades de estradiol, estrona, pregnenolona, progesterona, 17α-hidroxipregnenolona y 17α-hidroxiprogesterona. La dihidrotestosterona y el estradiol también se producen en tejidos periféricos por conversión de andrógenos y estrógenos precursores secretados en testículo y corteza adrenal.

La esteroidogénesis se activa en el feto entre las 8 y 18 semanas de gestación, período en el cual los andrógenos juegan un papel crítico en el desarrollo del tracto reproductivo masculino. Excepto un un leve y transitorio aumento a los 2 o 3 meses posparto, los niveles de testosterona caen y permanecen muy bajos hasta la pubertad. Al iniciarse la pubertad se activa la producción de LH en hipófisis. Esta hormona se une a receptores en las células de Leydig, donde estimula la síntesis y secreción de testosterona, que se mantiene durante el resto de la vida, con una gradual declinación en la senescencia.

Las células de Sertoli poseen receptores para FSH y andrógenos. Estas hormonas promueven la producción de diversos polipéptidos, entre ellos *inhibina*, que frena la secreción de FSH en hipófisis, *activina* de acción opuesta a la de inhibina, diversas *citoquinas* y *proteína de unión de andrógenos*, similar a la globulina que transporta hormonas sexuales en plasma. Esta proteína fija testosterona y asegura el mantenimiento de elevados niveles de la hormona dentro del testículo. En las células de Sertoli también existe una *aromatasa* que cataliza la conversión de testosterona en estrógenos.

Biosíntesis de testosterona. La testosterona se genera a partir de colesterol (fig. 26-19). En testículo, casi la mitad del colesterol necesario para estos fines se sintetiza *de novo* en las células de Leydig; el resto es tomado de las LDL del plasma por endocitosis mediada por receptores.

En una primera etapa, el colesterol, compuesto de 27 carbonos, es convertido en otro de 21, la pregnenolona, por el complejo multienzimático *20,22-desmolasa*, localizado en mitocondrias.

Desde pregnenolona existen dos vías alternativas: 1. Vía de la progesterona. Sucesivamente se forman progesterona, 17α-OH-progesterona, androstenediona y testosterona. 2. Vía de la deshidroepiandrosterona. Se forman 17α-OH-pregnenolona, deshidroepiandrosterona, androstenediol y testosterona. Las etapas desde 17α-OH-pregnenolona y 17α-OH-progesterona a deshidroepiandrosterona y androstenediona respectivamente implican la pérdida de la cadena de dos carbonos en posición 17; los compuestos iniciales de 21 C dan productos de 19 C. Las enzimas comprometidas en estas vías, indicadas en la figura 26-19, se encuentran en membranas del retículo endoplásmico liso; la mayoría son oxidasas de función mixta ligadas a citocromo P_{450}. Tres de ellas (20,22-desmolasa, 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa y 17α-hidroxilasa) son las mismas de las vías de síntesis de glucocorticoides y andrógenos adrenales.

La proteína regulatoria aguda de esteroidogénesis (StAR) es uno de los factores involucrados en la síntesis de la hormona.

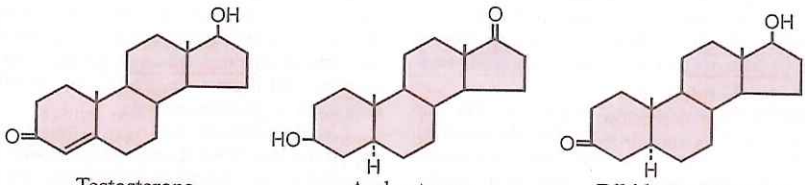


Fig. 26-18. Esteroides con actividad androgénica.

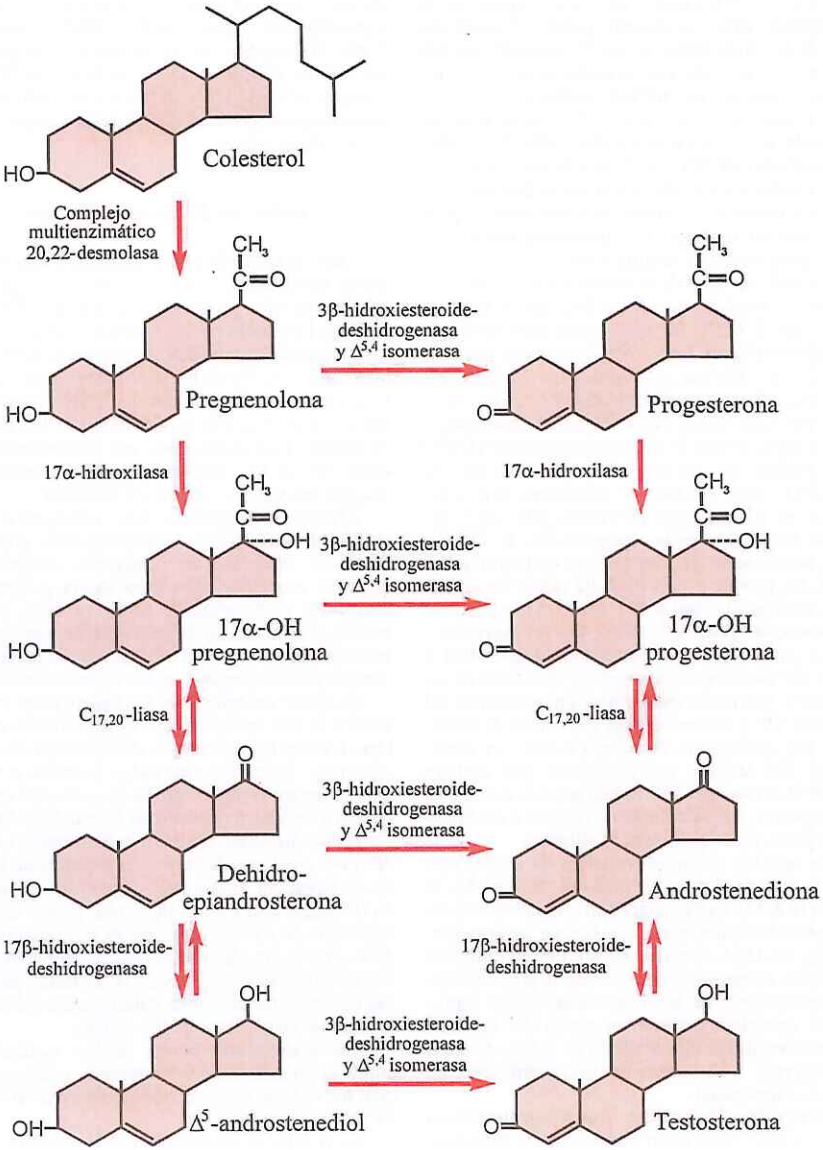


Fig. 26-19. Biosíntesis de testosterona.

Los testículos de un adulto normal liberan entre 4 y 12 mg de testosterona por día. La hormona pasa a la sangre, donde es transportada unida a proteínas. Cerca del 60% de los andrógenos circulantes se unen con gran afinidad a la β *globulina fijadora de esteroides sexuales*. Casi el 40% de la testosterona forma complejos con otras proteínas, principalmente albúmina; ésta tiene menor

afinidad por la hormona, pero gran capacidad de transporte. Sólo una pequeña porción (menos del 2%) de los andrógenos en sangre permanece libre y atraviesa rápidamente las membranas celulares; por ello es la forma biológicamente activa.

La síntesis y secreción de testosterona es activada por la hormona estimulante de células intersticiales (ICSH o LH) de adenohipófisis. La FSH también tiene importante participación en la función testicular. Contribuye a aumentar el peso del testículo. Estimula la espermatogénesis, pero no la producción de andrógenos.

Cuando el nivel de testosterona en sangre aumenta, se produce un efecto inhibitorio sobre la secreción de ICSH (retroalimentación negativa).

Metabolismo. La testosterona puede ser convertida en *dihidrotestosterona* (fig. 26-18) y estrógenos. Estas transformaciones ocurren en el testículo y, en mayor proporción, en otros tejidos.

La testosterona da dihidrotestosterona (DHT) por acción de *5α-reductasa* dependiente de NADPH. Esta enzima se encuentra principalmente en hígado, piel (folículos pilosos) y órganos accesorios de la reproducción. El 8% del total de testosterona secretada es metabolizada a DHT, un producto con más del doble de actividad, razón por la cual se la considera la verdadera hormona; la testosterona sería una prohormona.

La producción de estrógenos (*estradiol*) a partir de testosterona comprende una serie de reacciones: hidroxilación, oxidación, remoción del carbono 19 y aromatización del anillo A catalizada por *aromatasa*, complejo inserto en membranas del retículo endoplásmico, que incluye NADPH-citocromo P_{450} reductasa. La aromatasa se encuentra en las células de Sertoli y en diversos tejidos, principalmente el adiposo.

En otra vía de transformación de la testosterona se reduce el grupo cetona del carbono 3 y se satura la doble ligadura del anillo A del ciclopentanoperhidrofenantreno para formar *androsterona* (fig. 26-18) y *etiocolanolona*, que se eliminan por orina conjugadas con sulfato o glucuronato. Los metabolitos de hormonas testiculares representan aproximadamente un tercio del total de 17-cetoesteroides eliminados por orina; el resto corresponde a derivados de los andrógenos de corteza suprarrenal.

Mecanismo de acción. Tanto la testosterona como la DHT atraviesan libremente las membranas celulares y alcanzan a su receptor, proteína de 110 kDa perteneciente a la familia de receptores de esteroides, localizada en el citosol y en el núcleo de las células "blanco". El mismo receptor fija testosterona o DHT; la afinidad es mayor para esta última. Antes de la unión a hormona, el receptor se encuentra inactivo, asociado a proteínas de shock térmico (HSP). Cuando se forma el complejo hormona-receptor se produce un cambio conformacional, se libera la HSP, el receptor se dimeriza y se fija al elemento de respuesta específico en el ADN, desde donde regula la expresión génica.

Acciones de los andrógenos

Efectos sobre órganos genitales. Los andrógenos estimulan el desarrollo de los órganos de la reproducción y glándulas accesorias. El desarrollo del testículo no depende exclusivamente de los andrógenos, también participan gonadotrofinas. La activación de la espermatogénesis requiere la presencia de testosterona, FSH y otros factores, en su mayoría producidos por las células de Sertoli. Los andrógenos son responsables del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios propios del varón. y mantiene la líbido.

Efectos metabólicos. Los andrógenos estimulan el anabolismo, particularmente proteico. Producen retención de nitrógeno, aumento de la masa muscular, descenso de la proporción de lípidos y retención de sodio, potasio, calcio, fosfato y sulfato. En hígado y riñón también se manifiestan los efectos anabólicos de proteínas, aunque mucho menos notables que en músculo.

El efecto anabólico de los andrógenos ha llevado a su uso incontrolado, especialmente en atletas e individuos deseosos de aumentar su masa muscular. Todos los esteroides anabólicos retienen en mayor o menor grado su actividad androgénica y su abuso produce efectos indeseables.

Los andrógenos también actúan sobre el tejido óseo, en el cual la respuesta depende de la dosis de hormona. Dosis bajas, como las existentes en la sangre antes de la pubertad, producen proliferación de cartílago epifisario, con incremento de la síntesis de glicosaminoglicanos y colágeno. Concentraciones elevadas de la hormona estimulan la captación de calcio, calcificación del hueso y promueven el cierre de las epífisis.

Los andrógenos tienen acción estimulante sobre la síntesis de eritropoyetina, razón por la cual los valores del hematócrito son más altos en varones que en mujeres.

En el feto, la testosterona es importante para la masculinización. Promueve la supervivencia del conducto de Wolff y su diferenciación en epidídimo, ductos deferentes y vesículas seminales. La DHT es mediadora de la diferenciación y desarrollo de las estructuras urogenitales masculinas.

En testículo fetal y puberal, las células de Sertoli secretan *sustancia inhibidora de los conductos de Müller* (MIS, de *Müllerian inhibiting substance*), una proteína de 150 kDa. En el feto, causa degeneración de los conductos de Müller. También se produce MIS, en cantidad muy pequeña, en adultos. Actúa directamente sobre células de Leydig en forma paracrina, con efectos inhibitorios sobre la síntesis de andrógenos.

La hormona *tipo insulina 3* (Insl-3, de *Insulin like-3*), de la familia de péptidos tipo insulina, es secretada por células de Leydig después del nacimiento y aumenta marcadamente durante la pubertad. Ratones adultos con mutación en el gen de Insl-3 muestran falta de descenso de los testículos desde la cavidad abdominal al escroto (criptorquidia) y alteraciones de la espermatogénesis. Si bien la Insl-3 no es esencial para la espermatogénesis, tiene algún papel en la fertilidad masculina.

Alteraciones clínicas

Deficiencia de 5α-reductasa. La falta de actividad 5α-reductasa afecta la producción de dihidrotestosterona. En pacientes varones los genitales externos están incompletamente desarrollados y pueden ser erróneamente considerados como de sexo femenino en el momento del nacimiento (hermafroditismo masculino incompleto).

Síndrome de insensibilidad a andrógenos. Es un defecto hereditario del gen en el cromosoma X que controla la síntesis del receptor de testosterona y DHT. La deficiencia puede ser total o parcial. Tienen testículos intraabdominales y fenotipo femenino. Configura el cuadro de seudohermafroditismo masculino.

OVARIO

Los ovarios contienen las células germinales femeninas (ovocitos) y producen hormonas esenciales para la reproducción y el desarrollo de los caracteres sexuales femeninos.

Las principales hormonas esteroides producidas en ovario son: a) hormonas foliculares o estrogénicas, secretadas por células del folículo de de Graaf en desarrollo, b) hormona progestacional o progesterona, producida en el cuerpo lúteo que se forma en ovario a partir de la ruptura del folículo y c) hormonas androgénicas, principalmente androstenediona y testosterona.

La síntesis de los esteroides ováricos es controlada por las gonadotrofinas hipofisarias, hormonas luteinizante (LH) y foliculoestimulante (FSH).

Además, en el ovario se producen hormonas de naturaleza peptídica: *relaxina,* secretada por el cuerpo lúteo durante el embarazo, y *activina* e *inhibina*, aisladas del líquido folicular.

Hormonas ováricas

Estrógenos. Sintetizados en células de la granulosa y folículos antrales. Difieren de todos los otros esteroides por tener el anillo A aromático y carecer de carbono 19 (grupo metilo en C10). En el ovario se producen *estradiol* y *estrona* (fig. 26-20); ambas son interconvertibles. El estradiol es el estrógeno más importante.

Progesterona (fig. 26-21). Se genera en todas las células esteroidogénicas de ovario, especialmente en el cuerpo lúteo, formación que se desarrolla en ovario a partir del folículo roto durante la ovulación. También se produce en la placenta, particularmente al final del embarazo y en la corteza adrenal, como metabolito intermedio en la síntesis de corticoesteroides (fig. 26-11).

Andrógenos. Androstenediona y testosterona se producen principalmente en células intersticiales y de la teca folicular.

Biosíntesis y metabolismo. El precursor de todas las hormonas esteroides es el colesterol. Si bien una pequeña proporción del colesterol utilizado por el ovario es sintetizado localmente, la mayor parte es tomada de la sangre, donde es vehiculizado por las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Las LDL se fijan a receptores específicos en la membrana y son internalizadas por endocitosis. El colesterol liberado en los lisosomas es enviado a las mitocondrias por la *proteína esteroidogénica regulatoria aguda* (StAR).

La vía de síntesis lleva a androstenediona y testosterona por etapas idénticas a las descriptas para esta última (pág. 548). Androstenediona y testosterona son convertidas en estrona y estradiol respectivamente por acción de la *aromatasa* que cataliza una compleja serie de reacciones: hidroxilaciones, oxidaciones, eliminación del C19 y aromatización del anillo A. Excepto la primera etapa, de colesterol a pregnenolona, catalizada por el complejo mitocondrial *20,22-desmolasa*, todas las reacciones de la vía de síntesis se cumplen en retículo endoplásmico.

Las enzimas involucradas en la síntesis, menos las 3β- y 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasas, son oxidasas de función mixta que requieren oxígeno molecular, NADPH, citocromo P_{450} y un sistema de transporte de electrones.

La progesterona y los andrógenos son productos intermediarios en las vías de síntesis de testosterona y estrógenos (figs. 26-19 y 26-22).

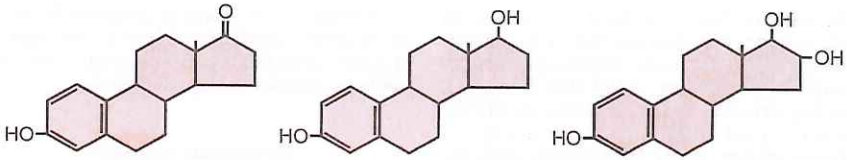


Fig. 26-20. Estrógenos.

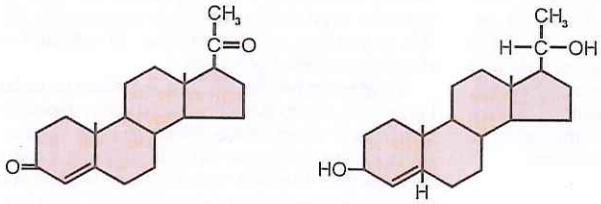


Fig. 26-21. Progestágenos.

La síntesis de estrógenos es estimulada por las gonadotrofinas hipofisarias (FSH y LH). La estrona y el estradiol pasan a la sangre, en la cual se transportan unidos a proteínas del plasma; alrededor del 60% se une a la *globulina fijadora de esteroides sexuales* y 20% a albúmina. La hormona ligada está en equilibrio con la fracción libre, cerca del 20% del total circulante, que es la forma biológicamente activa. Los andrógenos se unen a las mismas proteínas. La progesterona se fija con baja afinidad a transcortina y albúmina.

Los estrógenos son metabolizados predominantemente en hígado; la función cetona del C17 se reduce a –OH y se adiciona otro hidroxilo en el C16. El compuesto resultante se denomina *estriol* (fig. 26-20), principal estrógeno eliminado por orina, conjugado con sulfato o glucuronato.

Los principales metabolitos de la progesterona son pregnandiol (fig. 26-21) y pregnantriol, que se excretan conjugados como glucuronatos.

Mecanismo de acción. Es el común para todos los esteroides. Los receptores se encuentran en el núcleo de las células efectoras unidos a pro-

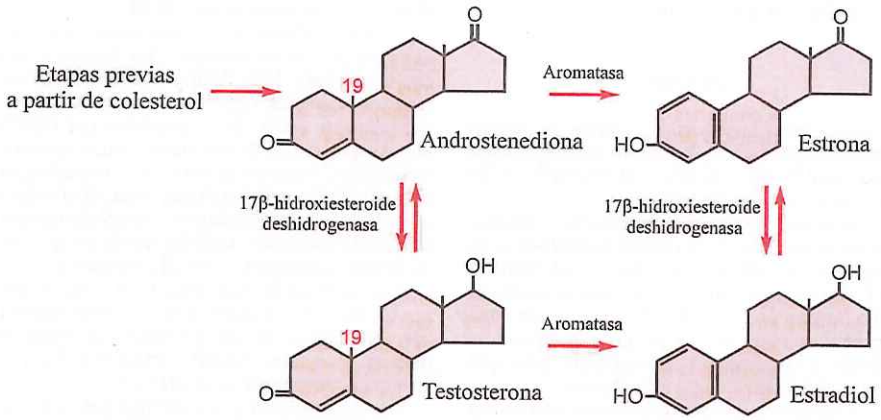


Fig. 26-22. Biosíntesis de estrógenos. Las etapas previas a partir de colesterol están indicadas en la figura 26-19.

teínas HSP. El esteroide atraviesa la membrana plasmática y alcanza los receptores para formar el complejo HR. Hay dos clases de receptores de estrógenos, α y β, que difieren en su distribución tisular. Los receptores β tendrían capacidad para modular la actividad de los α.

La asociación de la hormona con el receptor provoca un cambio conformacional que determina liberación de la HSP y dimerización. El dominio en dedos de zinc del receptor reconoce sitios específicos en el ADN (elementos de respuesta a hormona) a los cuales se une para modular la actividad de transcripción y de síntesis de proteínas (fig. 25-2).

Acciones de los estrógenos

Efectos sobre órganos genitales. Promueven el desarrollo de ovario, trompas, vagina y útero. El aumento de peso del útero producido por estrógenos corresponde realmente a proliferación celular.

Preparan la mucosa uterina para la acción posterior de las hormonas progestacionales. Estimulan el desarrollo del endometrio y aumentan notablemente su vascularización. Producen cambios característicos en el epitelio de los tubos de Falopio y vagina. Son responsables de la expresión y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios femeninos.

Efectos metabólicos. Tienen acción anabólica característica en los órganos genitales femeninos. Producen aumento de la captación de agua, sodio, aminoácidos y glucosa por parte de las células del miometrio. Estas acciones son secundarias a la estimulación de la síntesis de proteínas. La acción anabólica sobre metabolismo proteico es débil en músculo, hígado y riñón.

Antagonizan los efectos de la insulina en tejidos periféricos; disminuyen la tolerancia a la glucosa. Reducen la concentración de colesterol en plasma y aumentan los niveles de HDL.

Estimulan en el hígado la síntesis de las proteínas transportadoras de hormonas tiroideas y sexuales y de transcortina.

Favorecen el crecimiento del hueso y el cierre de las epífisis en la pubertad; inhiben la actividad de osteoclastos. En mujeres adultas participan en el remodelado del hueso y juegan un papel crucial en el mantenimiento de la masa ósea. La rápida disminución de la secreción de estrógenos es un factor importante de la osteoporosis, común después de la menopausia.

Acciones no genómicas. Se han observado efectos inducidos por estradiol no mediados por sus receptores nucleares. Por ejemplo, rápido aumento de la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ en células de endometrio, en ovocitos en maduración y en células de la granulosa. También hay acciones directas sobre el sistema vascular. El estradiol activa la óxido nítrico sintasa y produce vasodilatación.

Acciones de progestágenos

Efectos sobre órganos genitales. La progesterona aparece en sangre después de la ovulación, favorece el desarrollo del endometrio y prepara el útero para la recepción del embrión. También suprime el estro, la ovulación y la producción de LH, trofina que estimula la formación del cuerpo lúteo.

Cuando el óvulo es fecundado, el cuerpo lúteo se mantiene, la ovulación y la menstruación se suspenden; altos niveles de progesterona son importantes no sólo para facilitar la implantación, sino también para mantener el embarazo, estimulando el crecimiento uterino y oponiéndose a la acción de factores que tiendan a contraer el miomerio

En la glándula mamaria; activa el desarrollo de los ácinos glandulares durante el embarazo. Cuando el óvulo es fecundado, el cuerpo lúteo se mantiene; la ovulación y la menstruación se suspenden.

La progesterona es responsable de la elevación de la temperatura corporal basal que ocurre durante la segunda mitad del ciclo menstrual.

Juntamente con los estrógenos, la progesterona regula la producción en el hipotálamo de hormonas liberadoras de gonadotrofinas hipofisarias.

Derivados de progesterona son importantes componentes de fármacos utilizados como anticonceptivos.

Efectos metabólicos. Los gestágenos pueden ejercer efectos no específicos semejantes, aunque de intensidad mucho menor, a los de algunos glucocorticoides. Movilizan proteínas tisulares para su utilización en gluconeogénesis hepática. La progesterona puede actuar como inhibidor competitivo de la aldosterona en riñón; tiene acción natriurética.

Acciones no genómicas. La mayor parte de estas acciones se ejercen sobre las células germinales, ovocitos y espermatozoides. Los espermatozoides responden rápidamente a la progesterona iniciando la reacción acrosomal.

Anticonceptivos orales. Son combinaciones de estrógenos y progestágenos sintéticos que previenen la ovulación por inhibición de la secreción de gonadotrofinas.

El estrógeno reprime la secreción de FSH en hipófisis, provee estabilidad al endometrio y aumenta el número de receptores de progestágenos, con lo cual disminuye la dosis necesaria de éstos. Los progestágenos, en dosis farmacológicas, inhiben la ovulación por supresión de los pulsos de GnRH y la liberación de LH hipofisario. Impiden la implantación del óvulo e inducen la producción de mucus cervical muy espeso que dificulta la penetración de los espermatozoides.

Variaciones de los niveles de hormonas ováricas en sangre

La variacion cíclica en la producción de FSH y LH y, en consecuencia, de estrógenos y progesterona, determinan y condicionan los ciclos sexuales en la mujer.

Durante la primera mitad del ciclo, desde la menstruación hasta la ovulación, las trofinas hipofisarias FSH y LH estimulan la maduración de algunos folículos ováricos de los cuales sólo uno llegará a completo desarrollo. Los folículos en maduración comienzan la síntesis de hormonas estrogénicas, cuyo rápido incremento en sangre estimula la liberación de LH. En el momento de la ovulación, los niveles de FSH, LH y estrógenos alcanzan su valor máximo. Comienza entonces la segunda fase del ciclo, o período postovulatorio; la concentración de FSH, LH y estrógenos cae bruscamente (fig. 26-23).

El folículo roto se transforma en cuerpo lúteo, el cual secreta activamente progesterona y también estrógenos, cuyos niveles elevados en sangre inhiben la producción de FSH y previenen la maduración de nuevos folículos.

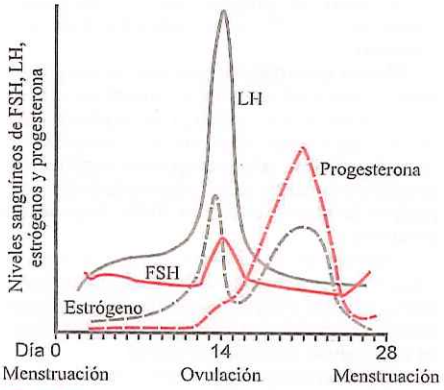


Fig. 26-23. Niveles sanguíneos de hormonas durante el ciclo sexual femenino.

Si no se produce fecundación del óvulo, el cuerpo lúteo comienza a degenerar y los niveles de estrógenos y progesterona disminuyen bruscamente. Esto acontece alrededor del vigésimo sexto día del ciclo y determina la hemorragia menstrual y la iniciación de un nuevo ciclo de producción de FSH y LH (fig. 26-23).

Si el óvulo es fecundado y se produce el embarazo, hay aumento paulatino de estrógenos y progesterona durante la primera mitad del ciclo de gestación.

El desarrollo de la placenta, órgano capaz de sintetizar gonadotrofinas y además estrógenos y progesterona, contribuye notablemente a incrementar los niveles circulantes de esas hormonas.

Al comenzar la segunda mitad del embarazo, el aumento de estrógenos y progesterona se hace más rápido, para llegar a un máximo alrededor del sexto mes. Este nivel elevado se mantiene hasta el término. Inmediatamente antes de iniciarse el trabajo de parto, hay una caída brusca de estrógenos y progesterona. A lo largo del embarazo los cambios en las concentraciones de hormonas foliculares y progestacionales siguen un curso paralelo.

Hormonas peptídicas de ovario

Relaxina. Se produce en el cuerpo lúteo durante el embarazo. También se la ha encontrado en tejido decidual. Su producción es estimulada por gonadotrofina coriónica.

Está constituida por dos cadenas peptídicas unidas por puentes disulfuro. Su estructura tiene homologías con la insulina.

Inhibe la motilidad uterina y favorece la relajación de estructuras del tracto reproductivo durante la gestación.

Inhibinas. Fueron aisladas del líquido folicular. Se producen en mayor cantidad en folículo preovulatorio y cuerpo lúteo de primates. Es un heterodímero de cadenas α y β. Se han caracterizado dos formas, ambas de 32 kDa. Ejercen control inhibitorio sobre la secreción de hormona foliculoestimulante (FSH) en hipófisis. Junto con folistatina, se oponen a la acción de activina. La relación activina/inhibina cambia durante el desarrollo del folículo, en las etapas más tempranas predomina la activina, que declina posteriormente, mientras la inhibina aumenta.

Activinas. Son homodímeros de cadenas β similares a las de inhibina, con propiedades funcionales opuestas a las de esta hormona. La GnRH activa la síntesis de activina la cual, a su vez, estimula selectivamente la secreción de FSH. Ejer-

ce primariamente acción paracrina en el ovario, donde aumenta la expresión del gen del receptor de FSH. Promueve la proliferación de células de la granulosa, favorece el desarrollo del ovocito, retarda la luteinización del folículo. Existen evidencias que sugieren un papel de la activina en procesos de diferenciación celular.

Folistatinas. Se producen en células foliculares. Son proteínas de alrededor de 40 kDa que fijan activina con gran afinidad y neutralizan su actividad biológica.

PARATIROIDES

Las paratiroides son cuatro pequeñas glándulas, del tamaño de granos de arroz, localizadas detrás de la tiroides. Producen una hormona cuya función es regular la cantidad de calcio en el organismo y mantener su nivel en sangre dentro de estrechos límites.

Hormona paratiroidea (PTH)

Es una proteína constituida por una cadena lineal de 84 aminoácidos, cuya masa molecular es de 9.500 Da. Estudios de hidrólisis parcial de la hormona mostraron que la actividad biológica de esta molécula reside en el segmento formado por los primeros 34 aminoácidos, responsables de la unión al receptor.

La glándula sintetiza precursores inactivos, de mayor tamaño que la hormona. El producto original del gen es una proteína de 115 aminoácidos y 13 kDa, la preprohormona paratiroidea, que en el retículo endoplásmico pierde un segmento de 25 restos aminoacídicos en su extremo N-terminal (péptido líder o señal) para formar la prohormona, de 90 aminoácidos. La prohormona pasa al aparato de Golgi, donde tiene lugar una nueva hidrólisis, con pérdida de los primeros 6 aminoácidos, catalizada por una enzima llamada *furina*. Se genera así la hormona paratiroidea activa, la cual es enviada al citosol empaquetada en gránulos secretorios. A diferencia de otras glándulas, la paratiroides no almacena hormona; el depósito existente en las células es generalmente pequeño, sólo puede mantener una secreción intensa durante una hora y media como máximo.

Secreción. Tanto la síntesis como la secreción de la hormona son reguladas por la concentración extracelular de Ca^{2+}. El principal estímulo para la secreción de PTH es la disminución de la concentración de Ca^{2+} circulante. A su vez, aumentos exagerados de la calcemia inhiben la liberación de hormona desde la glándula.

Normalmente, la concentración de calcio en plasma se mantiene con gran constancia alrededor de 10 mg por dL (2,5 mM). En realidad, el estímulo de la secreción de PTH es el descenso de la concentración de calcio *iónico* [Ca^{2+}]. Del total de calcio en plasma, el 50% está presente en forma ionizable (normalmente 1,25 mM). El resto se encuentra unido a albúmina (40%) o en complejos no disociables (10%) (ver pág. 640). Mientras la [Ca^{2+}] se mantiene en el nivel normal, no existen mayores variaciones en la liberación de PTH desde la glándula, que la sintetiza y segrega a un ritmo basal constante.

Cuando la calcemia disminuye por debajo de 9 mg por dL ([Ca^{2+}] ~1,12 mM), la secreción de hormona aumenta rápidamente a medida que la calcemia desciende, hasta alcanzar un máximo cuando se llega a 6 mg por dL ([Ca^{2+}] ~0,75 mM). A partir de este nivel, la liberación de PTH no aumenta más, aunque la calcemia siga disminuyendo.

Por otro lado, el incremento de la calcemia deprime la liberación de hormona desde la glándula. El efecto inhibitorio máximo se alcanza al llegar a 11 mg por dL ([Ca^{2+}] ~1,37 mM), pero nunca se llega a suprimir completamente la secreción, aunque se exceda ese valor.

La capacidad para detectar las fluctuaciones de la concentración de Ca^{2+} extracelular se debe a la existencia de un "sensor" en la membrana plasmática de las células de paratiroides, túbulos renales, células C de tiroides y también en otros tejidos. Este receptor de Ca^{2+} es una proteína de 120 kDa con tres dominios, el primero, extracelular, tiene regiones ricas en aminoácidos acídicos, probablemente comprometidos en interacciones con iones Ca^{2+}. El segundo está formado por siete hélices transmembrana características de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. El tercer dominio es el trozo C-terminal citoplasmático, acoplado a proteínas G_q y probablemente también a G_i.

En respuesta a aumentos de Ca^{2+} extracelular el receptor sufre un cambio conformacional, se activa fosfolipasa C y se pone en marcha el sistema de señales fosfatidilinositolbisfosfato que determina liberación de Ca^{2+} de depósitos intracelulares e ingreso de Ca extracelular a través de canales de membrana plasmática. Además, el sensor de Ca^{2+} también interacciona con proteínas G_i, deprime la adenilato ciclasa y disminuye los niveles de AMPc. No sólo el incremento de Ca^{2+} intracelular sino, probablemente, también la reducción de AMPc, son factores que tienden a suprimir la secreción de PTH por inhibición de la

fusión de los gránulos de depósito con la membrana plasmática.

En la mayoría de las células el Ca^{2+} estimula la exocitosis, que se inhibe cuando la $[Ca^{2+}]$ disminuye. En la paratiroides, en cambio, la liberación de PTH es mayor cuanto menor es el nivel de calcio. El Mg^{2+}, en concentraciones moderadas, parece cumplir el rol de activar la secreción en esta glándula. Sin embargo, la liberación de PTH es inhibida en la hipermagnesemia.

Las catecolaminas, actuando sobre receptores β-adrenérgicos, y el AMP cíclico estimulan la secreción; estas acciones tienen escasa significación. El más importante factor modulador de la secreción de PTH es la concentración de Ca^{2+}.

Los cambios de la $[Ca^{2+}]$ no sólo regulan la secreción sino también la síntesis de PTH, posiblemente por activación de la transcripción del gen correspondiente. La transcripción de este gen es inhibida por altos niveles de $1,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$.

Existe una relación inversa entre secreción de PTH y niveles de calcio iónico en plasma. El efecto inicial del aumento de Ca^{2+} es inhibir la liberación de PTH desde los gránulos secretorios.

Degradación. Principalmente en hígado y riñón la hormona es separada en dos trozos, de los cuales el correspondiente al extremo N-terminal (que contiene los primeros 34 aminoácidos) mantiene actividad; el otro es inactivo. La hormona entera y los dos segmentos pueden ser detectados en sangre circulante; el método de elección para determinarlos es el inmunorradiométrico (IRMA de *immunoradiometric assay*). La vida media de la hormona y la del segmento activo es de 2 a 4 minutos; ambos son degradados en los tejidos "blanco", riñón y hueso. El segmento C-terminal inactivo (aminoácidos 35 a 84) tiene vida media más larga (horas) y es eliminado por orina. No parece ser de importancia para la unión a los receptores de hueso y riñón.

Mecanismo de acción. Los receptores de hormona paratiroidea se acoplan a proteínas G_q y G_s en la membrana de las células efectoras. Existen dos tipos de receptores de esta hormona, PTH-1 y PTH-2. El receptor PTH-1 reconoce PTH y PTHrP (ver más adelante), mientras el PTH-2 es activado únicamente por PTH. La unión de PTH o PTHrP a sus receptores: a) activa proteína G_q, que estimula la fosfolipasa C, produciendo aumento de Ca^{2+} citosólico y activación de proteína quinasa C y b) actúa sobre proteína G_s, con elevación de la concentración de AMPc.

Acciones. La principal función de la PTH es contribuir, junto con otros factores, a mantener la concentración de calcio en el compartimiento extracelular. Para ello actúa a varios niveles: a) tejido óseo, b) túbulos renales y c) metabolismo de vitamina D (ver pág. 580). La Tabla 26-9 presenta un resumen de las acciones de PTH.

Tabla 26-9. Acciones de hormona paratiroidea.

En hueso
↑ Resorción y disolución del mineral ↑ Citrato y otros ácidos orgánicos en osteocitos ↑ Salida de Ca^+ hacia el líquido extracelular
En riñón
↑ Reabsorción de Ca^+ en túbulos distales ↑ Excreción urinaria de fosfato
Sobre metabolismo de vitamina D_3
↑ Formación de $1,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$: ↑ Absorción intestinal de Ca^+
General
↑ Calcemia

a) Efectos sobre hueso. El mineral del hueso es movilizado para mantener la homeostasis del calcio. La PTH pone en juego dos procesos: liberación de calcio (osteólisis) y resorción osteoclástica.

La hormona estimula la "bomba de calcio" (Ca^{2+}-ATPasa) y con ello el transporte activo de Ca^{2+} al líquido extracelular. Esta respuesta ocurre en pocos minutos y requiere la presencia de $1,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$, el metabolito activo de vitamina D. La PTH activa la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico en osteocitos; aumenta la producción de citrato y otros ácidos orgánicos, lo cual favorece la solubilización del mineral del hueso.

La PTH promueve la diferenciación de células precursoras en osteoclastos y activa la producción de citoquinas estimulantes de la resorción ósea. Este efecto es más lento (horas a días) que el de osteólisis.

El resultado final es remoción y destrucción del mineral y la matriz del hueso, acciones que determinan pasaje de calcio hacia el espacio exterior.

b) Efecto sobre riñón. La PTH estimula la reabsorción de Ca^{2+} en túbulos contorneados distales del nefrón. Disminuye la excreción de calcio por orina. La mayor parte de la reabsorción de Ca^{2+} se realiza predominantemente en el túbulo proximal (en mucho menor proporción en la rama ascendente gruesa del asa de Henle) y no es regulada por PTH. Aunque la hormona controla sólo el 10% del total de calcio reabsorbido, tiene importantes efectos.

Cuando la concentración de fosfato es elevada en plasma, la PTH aumenta la eliminación de fosfato, pues reduce su reabsorción en nefrón proximal y, en menor proporción, en el distal.

La movilización del mineral del hueso aumenta el calcio y el fosfato circulantes. El incremento de la fosfaturia por la PTH tiende a prevenir la formación de fosfato de calcio, que se depositaría en tejidos blandos y reduciría el efecto hipercalcemiante.

La PTH disminuye la reabsorción renal de sodio, potasio, citrato y bicarbonato. Estas acciones tienden a producir discreta acidosis. La hormona también reduce la eliminación de ácido úrico por orina.

c) Efecto sobre metabolismo de vitamina D. La administración de PTH promueve la absorción intestinal de calcio. No es un efecto primario de la hormona, sino secundario a la formación de $1,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$, metabolito activo de la vitamina D_3 (pág. 581). Este compuesto es el factor hormonal responsable del incremento en la absorción de calcio en intestino. Se forma en riñón por hidroxilación de $25\text{-}OH\text{-}D_3$, metabolito derivado de vitamina D_3. Esta reacción de hidroxilación es activada por PTH.

Proteína relacionada con PTH (PTHrP). Normalmente es producida en tejidos fetales y adultos. La porción N-terminal tiene gran homología con la PTH y se une con igual afinidad a los receptores PTH-1 de hueso y riñón. Produce hipercalcemia, disminuye las concentraciones de fosfato y de AMP cíclico en riñón.

Durante el desarrollo intrauterino actúa como reguladora de la multiplicación y mineralización de condrocitos y del transporte de calcio en placenta. Posteriormente se comporta como factor del desarrollo y de diferenciación celular en glándula mamaria, piel e islotes de Langerhans. Tiene efectos tipo citoquinas durante la respuesta inflamatoria; es relajante de músculo liso y neuroprotector durante el envejecimiento.

En condiciones fisiológicas la acción de PTHrP es local (paracrina y autocrina).

Cuando se segrega en cantidades exageradas reduce la formación de $1,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$ y desacopla la resorción y neoformación de hueso, lo que resulta en graves pérdidas de tejido óseo.

Alteraciones de la función paratiroidea

Hipoparatiroidismo. Puede producirse por extirpación no intencional de las paratiroides en el curso de tiroidectomías. Hay disminución de la calcemia y aumento de la fosfatemia. El incremento de fosfatos en líquido extracelular promueve el depósito de fosfato de calcio en hueso, sustrae aún más Ca^{2+} de la circulación, y acentúa la hipocalcemia. La movilización de calcio óseo decrece tanto por reducción de la osteólisis osteocítica como de la resorción osteoclástica.

Como la síntesis de $1,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$ está deprimida, la absorción intestinal de Ca^{2+} es pobre. La reabsorción renal de Ca^{2+} se reduce, pero la calciuria no aumenta porque la calcemia es baja. Disminuye la excreción de bicarbonato y puede producirse alcalosis.

El síntoma más llamativo asociado a la hipocalcemia es la hiperexcitabilidad neuromuscular, que se manifiesta por parestesia en los dedos de manos y pies, calambres, reducción de la contractilidad del miocardio, intervalo QT prolongado en el electrocardiograma, irritabilidad, tetania y convulsiones.

Seudohipoparatiroidismo. Es un trastorno genético raro en el cual está afectado el receptor de PTH. Hay resistencia tisular a la hormona.

Hiperparatiroidismo. Puede ser primario o debido a tumores (adenomas) funcionantes de paratiroides, a insuficiencias renales que determinan pérdida continua de calcio por orina, o a deficiencias nutritivas con reducción sostenida en la ingesta de calcio.

Se produce activación de la movilización de calcio y fosfato del tejido óseo. Hay aumento de los niveles de calcio en plasma, hipercalciuria e hiperfosfaturia. Suelen formarse precipitados de fosfato de calcio en vías urinarias (cálculos) o en tejidos blandos. La desmineralización del hueso puede llevar a un cuadro de osteodistrofia generalizada.

Los altos niveles de calcio disminuyen la excitabilidad neuromuscular. A menudo hay sensación de fatiga, trastornos psíquicos, depresión, confusión mental. Se altera la función cardíaca; el intervalo QT en el electrocardiograma está acortado.

Algunos tumores malignos, como carcinoma de células escamosas de pulmón, cánceres de mama y riñón, secretan *proteína relacionada con hormona paratiroidea (PTHrP)* cuya porción terminal tiene homología con la PTH y se une con igual afinidad al receptor PTH-1 en hueso y riñón. La PTHrP en exceso produce un cuadro similar al del hiperparatiroidismo, con marcada hipercalcemia.

Uso terapéutico de PTH en osteoporosis. Si bien el hiperparatiroidismo causa pérdida de hueso, la administración de PTH en inyecciones diarias a pacientes con osteoporosis, ha mostrado resultados positivos: disminuye la reabsorción, hay restauración de la masa ósea, especialmente el hueso trabecular, y menor incidencia de fracturas. Este resultado, aparentemente paradójico, sugiere que hay diferencias en la acción de nive-

les elevados sostenidos y aumentos intermitentes de la hormona.

Calcitonina

En mamíferos es sintetizada y secretada por las células C (claras, de núcleo oval) de tiroides. Embriológicamente estas células derivan de la cresta neural (quinta bolsa branquial).

Es un péptido de 32 aminoácidos, de 3.600 Da. Un puente disulfuro determina la formación de un ciclo de seis aminoácidos, análogo al de vasopresina y oxitocina. Toda la molécula es necesaria para su actividad biológica; la pérdida de un solo aminoácido altera su capacidad funcional.

Su síntesis es dirigida por un gen que produce distintos ARNm por *splicing* alternativo. En células C genera una proteína precursora de 141 aminoácidos de la cual se forma calcitonina. En otros tejidos, particularmente en sistema nervioso central, el mismo gen dirige la síntesis de un precursor con 128 aminoácidos y da lugar a un péptido de 37 llamado *péptido relacionado con el gen de calcitonina* (CGRP de *calcitonin gene related peptide*), que actúa como neurotransmisor y potente vasodilatador.

El principal estímulo para la secreción de calcitonina es el aumento de la concentración extracelular de calcio. También activan la secreción algunas hormonas gastrointestinales (gastrina, secretina y colecistoquinina). Tiene una vida media de 5 a 10 minutos; es degradada en riñón. Actúa a través de receptores acoplados a proteína G_s; eleva el nivel de AMP cíclico en las células efectoras.

Acciones. La calcitonina produce rápida disminución de las concentraciones sanguíneas de calcio y fosfato. Administrada en cantidades superiores a las fisiológicas (dosis farmacológicas) ejerce acciones sobre hueso (disminución del número y actividad de osteoclastos) y riñón (disminución de la reabsorción tubular de calcio y fosfato).

Su papel fisiológico en el ser humano no es aún claro. Es una hormona muy importante en peces y aves, pero como la supresión quirúrgica de las células productoras de calcitonina no determina trastornos clínicos en el hombre, algunos autores piensan que su función no es esencial en humanos; sólo representaría una reliquia evolutiva.

Su relación con hormonas gastrointestinales ha sugerido que podría prevenir la hipercalcemia producida por alimentos ricos en calcio.

Desde el punto de vista clínico es de interés como "marcador" de tumores de tiroides y también como inhibidor de la actividad de resorción ósea de los osteoclastos.

La calcitonina tiene propiedades analgésicas; es efectiva en el tratamiento de algunos síndromes dolorosos. También ha sido usada en la osteoporosis, ya que aumenta la cantidad de calcio en hueso, pero su administración debe limitarse a dosis lo más bajas posible y en períodos cortos, ya que se observó el desarrollo de cáncer de diversos tipos en una alta proporción de pacientes.

RIÑÓN

Además de su función de mantener la constancia del medio interno, el riñón también actúa como órgano endocrino. Secreta a la circulación general hormonas con acción sistémica, como la *renina*, la *eritropoyetina* y el *calcitriol*. Además, al igual que otros órganos, sintetiza una variedad de agentes con acción paracrina o autocrina, como prostaglandinas, quininas o cininas, endotelina, urodilatina y dopamina. Estas sustancias ejercen sus efectos localmente, dentro del riñón.

Renina

La *renina* es una proteasa de unos 40 kDa, sintetizada en las células granulares del aparato yuxtaglomerular del nefrón como preprorrenina inactiva de 340 aminoácidos. La disminución de la presión arterial sistémica, del flujo sanguíneo renal, o de la concentración de Na^+ o Cl^- en el líquido tubular a la altura de la mácula densa (en el aparato yuxtaglomerular), estimulan la producción y secreción de renina.

La preprorrenina llega al retículo endoplásmico donde pierde un segmento de 23 aminoácidos de su extremo amino-terminal y se convierte en prorrenina. Esta pasa al aparato de Golgi donde es glicosilada y luego llega al citoplasma en vesículas cargadas de gránulos de secreción, a los cuales deben su aspecto las células granulares. La prorrenina es procesada en los mismos gránulos con pérdida del segmento pro, de 20 aminoácidos, para generar renina con actividad proteolítica, que se libera a la circulación; también puede ser secretada sin procesar. Entre el 50 y 90% de la renina total en plasma está incluida en la prorrenina, cuya función no se conoce.

La liberación de renina es controlada por varios factores: 1) la concentración de Na^+ y Cl^- del líquido tubular, captada por quimiorreceptores del aparato yuxtaglomerular; también existen sensores de la presión en la arteriola aferente del glomérulo (presión de perfusión renal); 2) impulsos del sistema nervioso simpático; 3) concentra-

ción de K^+ (la hipocaliemia la estimula y la hipercaliemia la deprime), y 4) angiotensina y péptido natriurético atrial.

En sangre, la renina actúa sobre *angiotensinógeno*, una globulina α_2 del plasma de unos 60 kDa, sintetizada en hígado. La renina cataliza la separación de un trozo de diez aminoácidos del extremo amino-terminal del angiotensinógeno. El decapéptido liberado, llamado *angiotensina I*, es fisiológicamente inactivo.

En plasma existe una dipeptidil carboxipeptidasa, la *enzima convertidora de angiotensina* (ACE), procedente de membrana plasmática de células del endotelio vascular. Esta enzima corta dos aminoácidos del extremo C-terminal de la angiotensina I y la convierte en *angiotensina II*. El octapéptido *angiotensina II* se une a receptores de membrana plasmática de las células "blanco". Hay dos tipos de receptores principales, AT1 y AT2. Los AT1 son los mediadores de casi todas las acciones de la angiotensina II. Los AT2, al parecer, estimulan la liberación de bradiquinina y óxido nítrico, que producen vasodilatación; también estarían comprometidos en la regulación de diferenciación y crecimiento celular.

Los receptores AT1 están acoplados a proteínas G_q y activan el sistema de señales de fosfatidilinositolbisfosfato. No se conoce a qué sistema se asocian los receptores AT2.

La activación de AT1 por unión de la angiotensina II resulta en las siguientes respuestas: 1) Vasoconstricción arteriolar sistémica que eleva la presión arterial por aumento de la resistencia periférica. 2) Retención de sodio y agua, lo cual eleva el volumen de plasma; hay un efecto estimulante directo sobre la reabsorción de Na^+ en el túbulo proximal del nefrón. 3) Activación de la secreción de aldosterona en la corteza adrenal. La aldosterona aumenta la reabsorción de Na^+ por la rama ascendente gruesa del asa de Henle, los túbulos distales y los conductos colectores. 4) Efecto *feedback*: inhibe la secreción de renina en riñón. En resumen, las acciones de la angiotensina II tienden a mantener el volumen y la presión en el sistema vascular. La vida media de angiotensina II en circulación es menor de 60 segundos.

En clínica se usan ampliamente inhibidores de la enzima convertidora para prevenir la formación de angiotensina II. También se utilizan bloqueantes de los receptores AT1. Estos fármacos producen vasodilatación de las arteriolas sistémicas y reducción de la presión arterial, inhibición de la secreción de aldosterona y disminución de la reabsorción de NaCl.

El sistema renina-angiotensina no sólo existe en la circulación sino también en varios tejidos (cerebro, corazón, riñón y testículo), en los cuales produciría angiotensina II de acción local.

Posteriormente se descubrió otra forma de enzima convertidora de angiotensina, la ACE2, presente únicamente en corazón, riñón y testículo. Como la ACE1, esta enzima es una carboxipeptidasa, pero sólo secciona un aminoácido en lugar de dos. Por acción de la ACE2 la angiotensina I es convertida en un nonapéptido (angiotensina 1-9), al parecer sin funciones fisiológicas. Se ha sugerido que, por su acción, la ACE2 prevendría la formación de angiotensina II.

La ACE2 hidroliza también angiotensina II para dar un heptapéptido (angiotensina 1-7) con acción vasodilatadora. Se piensa que esta enzima tendría un papel en el balance entre vasoconstrictores y vasodilatadores dentro de corazón y riñón, regulando así las funciones vasculares en estos órganos.

Otra enzima, aminopeptidasa A, elimina el residuo aspartato del extremo amino-terminal de angiotensina II y produce un heptapéptido llamado angiotensina III, con igual capacidad que angiotensina II para estimular la secreción de aldosterona.

Eritropoyetina

La *eritropoyetina* es una glicoproteína de 166 aminoácidos, de 30,4 kDa, 60% proteína, 40% carbohidrato. En el adulto es sintetizada en riñón y, en pequeña proporción, en hígado. En el feto y el recién nacido, el principal sitio de origen es el hígado. En riñón, el lugar de síntesis son las células del mesangio entre la corteza y la médula. Inicialmente se produce un precursor de 193 aminoácidos.

La síntesis y secreción son estimuladas por la reducción de la tensión de oxígeno en riñones. Esta puede ser debida a hipoxia, anemia, o deficiencias en el flujo sanguíneo renal. Se cree que al disminuir la presión parcial de oxígeno, se liberan prostaglandinas y éstas estimularían la secreción de eritropoyetina.

Desde la circulación, la eritropoyetina pasa a la médula ósea y se une a receptores en células precursoras eritroides. Los receptores pertenecen a la familia de los asociados a tirosina quinasa extrínseca (tipo JAK-2). Esta fosforila proteínas STAT intracelulares, que se dimerizan y penetran en el núcleo, donde activan la transcripción de diversos genes, entre ellos *c-myc*. Como respuesta hay estimulación de la actividad mitótica y diferenciación de células precursoras de eritroblastos. El resultado final es el aumento de la liberación de reticulocitos y glóbulos rojos a la circulación, au-

mentando la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre.

La administración de eritropoyetina en dosis adecuadas tiene efectos benéficos en la anemia de pacientes renales crónicos. Actualmente se dispone de eritropoyetina producida por técnicas de ADN recombinante para uso terapéutico en humanos.

Bradiquinina

Las quininas, o cininas, son hormonas de naturaleza peptídica, producidas en riñón a partir de un precursor plasmático inactivo llamado *quininógeno*. Las células de los túbulos distales del nefrón producen *calicreína*, una proteasa que hidroliza al quininógeno y libera *bradiquinina*, poderoso vasodilatador. Estimula la liberación de óxido nítrico y prostaglandinas y tiende a contrarrestar la reducción del flujo renal. Es rápidamente inactivada por la enzima convertidora de angiotensina.

Endotelina

La *endotelina* es un péptido de 21 aminoácidos. Se conocen tres formas, codificadas por genes diferentes (ET-1, ET-2 y ET-3). ET-1 es la forma predominante en riñón y es sintetizada por células endoteliales de vasos renales, células del mesangio y de los túbulos distales.

La angiotensina II, la adrenalina y la distensión de las paredes vasculares estimulan la secreción de endotelina.

Es un potente vasoconstrictor de las arteriolas aferente y eferente del glomérulo; reduce el flujo sanguíneo renal, inhibe la secreción de renina y aumenta la liberación de prostaglandina PGE_2.

Se ha observado aumento de endotelina en pacientes con hipertensión maligna, insuficiencia cardíaca, hipertensión pulmonar e infarto de miocardio. Un tipo raro de tumor, el hemangioendotelioma, segrega canatidades elevadas de endotelina y produce hipertensión arterial.

Urodilatina

La *urodilatina* es un péptido de 32 aminoácidos sintetizado en células de los túbulos distales. Tiene homología con el péptido natriurético atrial (ANP) (ver sección siguiente); sólo difiere de él por tener cuatro residuos adicionales en el extremo amino-terminal. Como el ANP, promueve la excreción de sodio.

Calcitriol

El *calcitriol* o 1,25-$(OH)_2$-D_3 es el metabolito activo de la vitamina D. En riñón se produce la etapa de hidroxilación final que genera esta hormona. Su síntesis y acciones se consideran en pág. 581.

CORAZÓN

Factor natriurético atrial

En miocitos de aurículas de mamíferos se había observado la presencia de gránulos semejantes a los que se almacenan en glándulas de secreción interna. La cantidad de esos gránulos se modifica cuando se altera el balance de sodio y agua.

El corazón se comporta como una glándula endocrina; produce una hormona llamada *factor natriurético atrial* (FNA), relacionada con procesos de excreción renal de sodio y agua y regulación del volumen de líquido extracelular y presión arterial.

El factor natriurético atrial comprende una familia de péptidos, constituidos por 24 a 28 aminoácidos. Todos estos péptidos comparten una porción de 17 aminoácidos que forma un ciclo debido a la existencia de un puente disulfuro. En seres humanos, la principal hormona circulante tiene 28 aminoácidos y una masa de 3.060 daltons; las formas más cortas (de 24 o 25 aminoácidos) poseen igual actividad biológica. Se los designa con el nombre de *péptido natriurético atrial* (PNA). Se han descripto otros péptidos (B y C) con homología estructural. El B (32 aminoácidos) también es producido en corazón y el C (22 aminoácidos) ha sido aislado en cerebro y endotelio vascular.

Se ha clonado el gen que codifica para esta hormona; el PNA se sintetiza originalmente como pre-prohormona inactiva de 151 aminoácidos. El péptido líder o señal es un trozo hidrofóbico de 24 aminoácidos en el extremo N-terminal. La prohormona se hidroliza para generar el péptido activo.

Mecanismo de acción. Existen receptores específicos para los péptidos natriuréticos atriales en varios tejidos efectores: renal, vascular y adrenal.

La hormona se une al receptor de membrana, activa la guanilato ciclasa en la porción citosólica del mismo receptor y aumenta el GMP cíclico, que actúa como segundo mensajero del FNA. Otro efecto observado en algunas células es inhibición de adenilato ciclasa, con disminución de AMP cíclico.

Acciones. El factor natriurético atrial actúa a varios niveles. a) *Sobre sistema renina-angiotensina*. Inhibe la secreción de renina. Esta acción puede, secundariamente, deprimir la secreción de aldosterona. También existen evidencias de efecto inhibitorio de la liberación de aldosterona por acción directa sobre adrenales. b) *Sobre riñón*. Estimula la excreción de agua y sodio; aumenta el volumen de filtrado en los glomérulos y disminuye la reabsorción de sodio en los túbulos. c) *Sobre sistema vascular*. Relaja la musculatura lisa, especialmente en las arteriolas de riñón; disminuye la presión arterial y el gasto cardíaco. d) *Sobre sistema nervioso*. Se ha demostrado unión de la hormona a células de cerebro, en sitios probablemente comprometidas con la regulación de los niveles de sodio y potasio, del volumen de líquido extracelular y de la presión arterial. El PNA inhibe la producción de vasopresina. Estos hallazgos sugieren que el péptido natriurético atrial podría servir como neurotransmisor, participando en el control general del sistema cardiovascular.

Alteraciones clínicas. En pacientes con insuficiencia cardíaca o renal y en personas con hipertensión esencial, se han encontrado niveles elevados de péptidos natriuréticos atriales en sangre circulante.

El acabado conocimiento de las acciones de estos péptidos auriculares ofrece nuevas perspectivas para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y renales.

HORMONAS GASTROINTESTINALES

Todas estas hormonas son péptidos, sintetizados y secretados a la circulación por células neuroendocrinas de las mucosas gástrica e intestinal en respuesta a estímulos que parten de la luz del tracto digestivo. Algunas pueden actuar como factores de crecimiento y mediadores de señales del sistema nervioso. Las células productoras de estas hormonas no están concentradas en formaciones glandulares discretas, sino ampliamente distribuidas entre las células exocrinas y absortivas de la mucosa gastrointestinal y en otros órganos constituyendo un sistema denominado APUD (de amine precursor uptake and decarboxylation) debido a su capacidad de captar compuestos aminados y decarboxilarlos. Se considerarán brevemente algunas de estas hormonas.

Gastrina

Producida por células G de la región antral de mucosa gástrica y en bulbo duodenal. Se sintetiza un precursor preprogastrina de 101 aminoácidos que sufre un procesamiento para dar varias formas moleculares fisiológicamente activas de 34, 17 y 14 aminoácidos. Su actividad está relacionada principalmente con un pequeño segmento de su extremo carboxilo terminal. La pentagastrina, péptido sintético compuesto por los cinco últimos restos aminoacídicos de la gastrina, se utiliza para estimular la secreción gástrica.

Se han identificado péptidos que reaccionan inmunológicamente como gastrina en sistema nervioso central y periférico, en hipófisis, adrenales, tractos respiratorio y genital. El páncreas fetal produce gastrina amidada, lo que sugiere un posible papel de esta hormona en el desarrollo pancreático.

La liberación de gastrina se produce normalmente en respuesta a la distensión del estómago y a la presencia en éste de alimentos ricos en proteínas. Aminoácidos aromáticos, péptidos pequeños y calcio son potentes estímulos de la secreción.

Las gastrinas amidadas de 17 y 34 aminoácidos se unen a receptores acoplados a proteína G_q que a través del sistema de señales de fosfatidilinositolbisfosfato activa a la fosfolipasa C. Estimula la liberación de histamina que, al unirse a receptores H_2 en la membrana basolateral de células parietales; induce la producción y secreción de ácido clorhídrico. Además ejerce acciones genómicas, modulando la expresión de genes. Activa la contractilidad del músculo liso del estómago, con lo que acelera su vaciamiento.

La gastrina también es secretada por células δ de los islotes de Langerhans en páncreas. Se han descripto casos de un tumor pancreático secretante de gastrina, que produce el llamado *síndrome de Zollinger-Ellison*.

Secretina

Sintetizada por células de la mucosa de duodeno y yeyuno. Es un polipéptido de 27 aminoácidos estructuralmente homólogo al glucagón. La presencia en duodeno del quimo ácido procedente del estómago es el estímulo para su liberación a la sangre. Se une con gran afinidad a receptores ligados a proteínas G_s que median la activación de adenilato ciclasa y elevan los niveles de AMPc; existe un receptor de baja afinidad acoplado a proteína G_q y al sistema de fosfatidilinositolbisfosfato.

Estimula la secreción de jugo pancreático rico en bicarbonato y pobre en enzimas, acción potenciada por colecistoquinina. Contribuye a neutralizar el quimo ácido que llega del estóma-

go al intestino. La secretina inhibe la secreción de HCl en estómago y retarda el vaciamiento del contenido gástrico.

Colecistoquinina (CCK)

Es sintetizada en células endocrinas de la mucosa de duodeno y yeyuno, en neuronas del plexo mioentérico y submucosa de estómago y colon, en las cuales actúa como neurotransmisor. En sistema nervioso central y otros órganos se han encontrado péptidos que reaccionan con anticuerpos contra CCK.

El procesamiento postraducción de la molécula precursora, de 115 aminoácidos, genera múltiples formas de *colecistoquinina* (CKK) de diferente extensión. En intestino se han identificado péptidos de 33, 39 y más aminoácidos. En cerebro se han aislado péptidos de 8 a 58 aminoácidos, resultantes del procesamiento de la prohormona de CKK. Los últimos cinco aminoácidos son idénticos a los de gastrina. CKK resultó ser la misma hormona que otros autores habían designado *pancreozimina*.

Se une con gran afinidad a receptores con siete dominios transmembrana que se expresan en células acinares de páncreas, vesícula biliar, células de mucosa gástrica y en sistema nervioso central y periférico.

La secreción es estimulada por triacilgliceroles, ácidos grasos de cadena larga, aminoácidos aromáticos y alifáticos y proteínas en el tracto intestinal. Los principales reguladores negativos son las sales biliares en duodeno.

Produce contracción de la vesícula biliar y relajación del esfínter de Oddi; CKK es el principal regulador de la motilidad de la vesícula. Aumenta la fuerza de la contracción del antro del estómago y del píloro. En páncreas estimula la secreción de jugo rico en enzimas o sus zimógenos (efecto de pancreozimina). Actuando directamente sobre receptores del núcleo arcuato de hipotálamo, la CCK produce inhibición del deseo de ingerir alimentos.

Son los neuropéptidos más abundantes del sistema nervioso central; actúan como neurotransmisores. Su unión a receptores del núcleo arcuato de hipotálamo produce reducción del apetito.

Péptido intestinal vasoactivo (VIP)

Es una molécula de 28 aminoácidos, estructuralmente homóloga de la secretina y glucagón, producida en distintos tipos de neuronas, en intestino, médula espinal, cerebro, pulmones, tracto urogenital y glándulas endocrinas.

Se han caracterizado receptores en epitelio de intestino, estómago, vesícula biliar, colon, páncreas exocrino, parótidas, linfocitos y hepatocitos. También en músculo liso de intestino y arteriolas.

Existe un tipo de receptores de alta afinidad acoplado a proteína G_s y otro de baja afinidad ligado a proteína G_q.

El VIP tiene potente acción vasodilatadora. Es un neuromediador con amplia gama de actividades biológicas. Desempeña un papel en la regulación de la motilidad del músculo liso, secreción pancreática e intestinal y flujo sanguíneo en el tracto gastrointestinal. Es un poderoso relajante de músculo liso intestinal y vascular.

Enteroglucagón

Es producido en células intestinales como parte de una molécula precursora cuyo procesamiento da origen a varios *péptidos tipo glucagón*. La primera ruptura hidrolítica del precursor genera *glicentina* (formada por los restos aminoacídicos 1 a 69, comprende péptidos relacionados con glucagón). Por ruptura de glicentina se forma *oxintomodulina* (aminoácidos 33 a 69, incluye el enteroglucagón, del cual forma parte el glucagón).

El enteroglucagón estimula el crecimiento de la mucosa de intestino. Péptidos tipo glucagón y oxintomodulina inhiben la secreción de ácido en estómago, retardan el vaciamiento gástrico y tienen efecto inhibitorio de la ingesta de alimentos.

Aumenta la secreción de insulina estimulada por glucosa y reduce la glucemia.

Ghrelin

Es un péptido de 28 aminoácidos expresado por células que se encuentran predominantemente en el estómago. Un escaso número de estas células se han identificado en intestino delgado y grueso. La molécula activa es acilada (la serina en posición 3 es octanoilada).

Ghrelin es la única hormona orexígena; está relacionada con la sensación de hambre previa a las comidas. El ayuno incrementa la actividad del gen de Ghrelin; los niveles circulantes aumentan antes de la ingestión de alimentos y se reducen después de la comida. Actúa por vía vagal; también directamente, ya que atraviesa la barrera hemato-encefálica y alcanza a varios centros regulatorios del apetito en el sistema nervioso, entre ellos el hipotálamo.

Además de estimular el apetito, tiene dos o tres veces mayor actividad sobre la liberación de hormona de crecimiento que la hormona liberadora de GH de hipotálamo. También contribuye a la regulación de la sensibilidad a la insulina y de la liberación de glucosa por el hígado; produce vasodilatación y deprime respuestas proinflamatorias.

La administración intravenosa de ghrelin aumenta la secreción de ácido en el estómago y estimula la motilidad gástrica.

Amilina

Péptido de 37 aminoácidos producido en células β de los islotes pancreáticos y en algunas células dispersas en estómago e intestino proximal. Tiene gran homología con el péptido relacionado con el gen de calcitonina y con la calcitonina. Ejerce su acción por interacción con una proteína modificadora y el receptor de calcitonina.

Disminuye la ingesta de alimentos e inhibe la secreción ácida de estómago. En dosis farmacológicas reprime el vaciamiento gástrico y la secreción de glucagón. Se ha postulado que el exceso de amilina podría tener relación con la patogenia de la diabetes.

Galanina

Existen dos formas moleculares, de 19 y 30 aminoácidos. Se expresan en sistema nervioso central y periférico, en hipófisis, en neuronas que inervan intestino, páncreas, tiroides y adrenales.

En intestino se encuentran predominantemente en neuronas de plexos mientéricos que inervan las capas circular y longitudinal del músculo liso. Actúan a través de receptores asociados a proteínas G.

Es liberada en respuesta a la distensión intestinal y otros estímulos que parten del tracto digestivo. En sistema nervioso es modulador de la transmisión neural, la sensación de dolor, la respuesta al estrés; participa en los procesos cognitivos y de memoria. Además, tiene efectos generales sobre el balance energético, la inmunidad innata, la inflamación y el cáncer. En aparato digestivo, regula la motilidad, el transporte intestinal de iones, inhibe el vaciamiento posprandial del estómago, la contracción de la vesícula biliar, las secreciones exócrinas del páncreas y modera la ingestión de alimentos.

Otros. Además de los mencionados, se han aislado otros péptidos producidos en la mucosa intestinal que cumplen diversas acciones de tipo hormonal. Sólo se mencionarán el *neuropéptido Y*, el *péptido YY* (de mucosa intestinal) y el *polipéptido pancreático* (de células PP de los islotes de Langerhans). Todos están relacionados con el control del apetito; el neuropéptido Y primariamente es secretado por neuronas de sistema nervioso central y periférico; es un potente estimulante de la ingesta de alimentos. El péptido YY y el polipéptido pancreático deprimen el apetito.

GLÁNDULA PINEAL

La glándula pineal de vertebrados es el principal sitio de secreción de una hormona llamada *melatonina*. Si bien en cantidad mínima, también se produce en otros tejidos, especialmente retina.

La melatonina es una indolamina derivada de triptófano; la serotonina o 5-OH-triptamina es uno de los metabolitos intermediarios de la vía de síntesis; las etapas finales son catalizadas por N-acetil y O-metil transferasas (ver pág. 349). La síntesis de las enzimas mencionadas y, en consecuencia, la de melatonina, está exquisitamente controlada. El ritmo circadiano de síntesis y secreción es regulado por vía neural desde el núcleo supraquiasmático del hipotálamo. En mamíferos, este núcleo es el "marcapaso" de los ciclos circadianos, entre ellos los de temperatura corporal, sueño, secreción de cortisol. Es posible que la glándula pineal, a través de la melatonina, module la sensibilidad del sistema circadiano a la luz ambiental y contribuya a sincronizar los "relojes biológicos".

La melatonina es liberada desde la pineal a la circulación durante el período de oscuridad del ciclo diario. La secreción es suprimida en individuos expuestos a luz intensa. Existen receptores específicos de melatonina en varias áreas del cerebro de mamíferos, notablemente en núcleo supraquiasmático. Algunos de esos receptores están acoplados a proteína G_i y otros a G_q. Los primeros inhiben a la adenilato ciclasa y reducen los niveles de AMPc; los segundos ponen en marcha el sistema de fosfatidilinositolbisfosfato.

A la melatonina se le adjudican, sin evidencias firmes, múltiples acciones, tales como inducción del sueño, efectos antienvejecimiento, activación sexual y muchas otras. De acuerdo con los datos experimentales disponibles, puede afirmarse que los pulsos de hormona en sangre circulante sirven de señal interna de los ciclos de luz-oscuridad en el ambiente y permiten ajustar en concordancia los ritmos circadianos del organismo.

En humanos, la administración de melatonina podría ser útil para reajustar los relojes biológi-

cos cuando se producen desfasamientos de los ritmos circadianos como consecuencia de extensos viajes transmeridianos, cambios en los horarios habituales de actividad u otras causas.

Análisis de los estudios publicados sobre efectos de la administración de melatonina en trastornos del sueño concluyen que aún no es posible dar respuestas firmes acerca de su eficacia. Como la hormona actualmente es un producto de venta libre, resulta difícil un control riguroso de resultados.

Las acciones sobre las funciones sexuales han sido observadas en especies con reproducción estacional. En ovinos, por ejemplo, la prolongación de los períodos diarios de oscuridad, con niveles elevados de melatonina, es la señal para la actividad reproductiva.

Además, algunas evidencias indican que tiene propiedades antiapoptóticas, actuaría en la prevención de tumores y en la modulación de la respuesta inmune.

Independientemente de su acción hormonal, se ha demostrado que la molécula de melatonina tiene gran capacidad como agente antioxidante *in vivo*.

EICOSANOIDES

Comprenden a *prostaglandinas* (PG), *tromboxanos* (TX), *prostaciclinas* (PGI) y *leucotrienos* (LT), compuestos derivados de ácidos grasos poliinsaturados de 20 carbonos. Son producidos por todas las células de mamíferos, excepto eritrocitos, y tienen una vida media efímera en el organismo. Poseen intensa actividad biológica, con efectos limitados a las propias células de origen o a sus vecinas; son hormonas locales o autacoides (acción autocrina o paracrina).

Los ácidos grasos precursores de estas sustancias se encuentran en las células en la posición 2 de fosfolípidos constituyentes de membranas y son liberados por hidrólisis catalizada por *fosfolipasa* A_2. El más importante de esos ácidos grasos es el *araquidónico* [20:4 (5,8,11,14)].

Las reacciones que convierten el ácido graso en prostaglandinas, tromboxanos o prostaciclinas se inician con la participación de *ciclooxigenasa* (pág. 312). Las prostaglandinas más comunes derivan del ácido araquidónico y poseen dos dobles ligaduras (pertenecen a la serie 2); las más importantes son PGE_2, $PGF_2\alpha$ y PGD_2 (fig. 26-24).

El tromboxano TXA_2 (fig. 26-25) es sintetizado principalmente en plaquetas y la prostaciclina PGI_2 se forma en el endotelio de vasos sanguíneos.

Los leucotrienos (fig. 26-26) derivan del ácido araquidónico por la vía de la *lipooxigenasa* (pág. 314). Se producen en leucocitos.

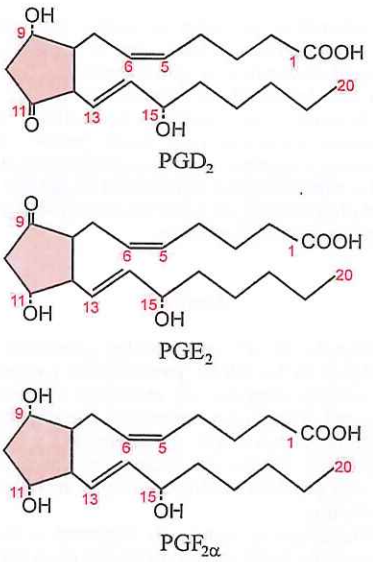


Fig. 26-24. Estructura de las principales prostaglandinas.

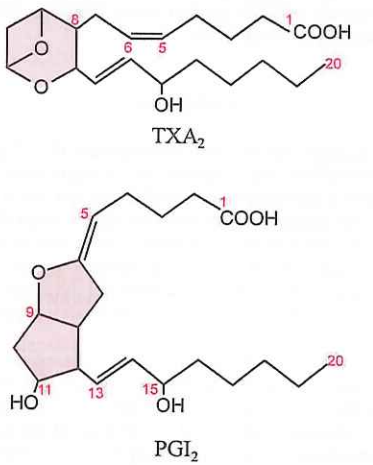


Fig. 26-25. Estructura de tromboxano y prostaciclina.

Los eicosanoides son rápidamente metabolizados; sus acciones moduladoras son en la mayoría de casos, paracrinas.

Mecanismo de acción. Los eicosanoides se unen a receptores específicos en la membrana plasmática de las células blanco. Algunos de esos receptores están asociados a proteínas G_s; su me-

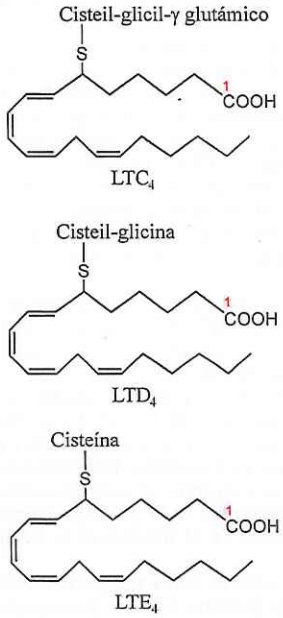


Fig. 26-26. Estructura de leucotrienos.

diador es el AMPc. Otros se acoplan a proteínas G_i e inhiben la adenilato ciclasa. Existe un tercer grupo de eicosanoides que utiliza receptores vinculados a proteínas G_q y fosfolipasa C. Su activación eleva los niveles de Ca^{2+} intracelular.

Acciones. Los eicosanoides promueven diversas acciones que alcanzan a todos los aparatos o sistemas del organismo: respiratorio, circulatorio, digestivo, reproductor, nervioso, endocrino. Es tan amplia la gama de efectos, que debemos limitarnos a mencionar algunos ejemplos.

Aparato respiratorio. La PGD_2 y $PGF_{2\alpha}$, el TXA_2 y los leucotrienos LTC_4, LTD_4 y LTE_4 producen contracción del músculo liso en bronquios, son bronquioconstrictores. Los más potentes en este sentido son los leucotrienos, cuya acción es de 100 a 1.000 veces más intensa que la de histamina. Los leucotrienos podrían ser los principales agentes desencadenantes de ataques de asma. Las PGE, por el contrario, son poderosos bronquiodilatadores.

Aparato circulatorio. PGE y PGI_2 son vasodilatadores, reducen la resistencia periférica y la presión arterial, mientras el tromboxano TXA_2 es vasoconstrictor.

La prostaciclina (PGI_2) inhibe la agregación de plaquetas; por el contrario, el TXA_2 es un poderoso agregante de plaquetas.

Aparato digestivo. PGE y PGI tienen acción inhibitoria de la secreción en estómago; disminuyen el volumen, la acidez de jugo gástrico y la actividad de pepsina. También poseen acción citoprotectora, probablemente por estímulo de la producción de mucus.

Las PGE favorecen la peristalsis en estómago e intestino, pues producen contracción de la musculatura lisa longitudinal y relajación de la circular. La $PGF_{2\alpha}$ activa la contracción tanto de fibras circulares como longitudinales. En cambio, la PGI_2 inhibe la motilidad de ambos tipos de fibras en toda la musculatura del tracto gastrointestinal.

Aparato reproductor. Prostaglandinas, particularmente PGE_2, actuando sobre hipotálamo, están implicadas en la regulación de la secreción de hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH); también estimulan la liberación de LHRH.

El aumento de la síntesis de $PGF_{2\alpha}$ parece ser el principal factor en la iniciación del trabajo de parto: esta prostaglandina estimula la contracción de la musculatura uterina. La oxitocina sería más importante recién en el segundo estadio del parto.

Las PG participan en el proceso de ovulación; son necesarias para la ruptura del folículo. Tienen también acción luteolítica.

Sistema nervioso autónomo. Las PGF facilitan la liberación de neurotransmisores. Al contrario, la PGE_2 frena la liberación de noradrenalina; actúa en forma inhibitoria sobre terminales presinápticas.

Inflamación. Las PGE y leucotrienos favorecen el proceso inflamatorio durante la fase inicial. Producen activación de la agregación y movimientos de leucocitos polimorfonucleares y aumentan la permeabilidad vascular.

La sustancia de reacción lenta de anafilaxia, importante en la producción de los accesos de asma y reacciones de hipersensibilidad, es una mezcla de leucotrienos LTC_4, LTD_4 y LTE_4.

Los efectos antiinflamatorios de los corticoesteroides en parte se deberían a la inhibición de fosfolipasa A_2, la cual reduce la liberación de ácido araquidónico y, en consecuencia, la síntesis de eicosanoides. Esta propuesta no es aceptada por todos los autores.

FACTORES DE CRECIMIENTO

El desarrollo de un nuevo ser a partir de la célula huevo comprende una intensa actividad mitótica (un ser humano adulto está constituido por alrededor de 10^{18} células, todas generadas por divisiones sucesivas de una célula original). Al mismo tiempo, las células neoformadas se dife-

rencian en una extensa variedad de tejidos con muy diversa capacidad funcional.

El crecimiento y el desarrollo son procesos muy complejos que implican activación y represión selectiva de genes y, por ende, la interacción de numerosos factores exquisitamente regulados.

La multiplicación celular no cesa en el adulto. Excepto en unos pocos tipos celulares, continúa durante toda la vida del individuo. Esta actividad también es regulada, a fin de mantenerla dentro de los límites del funcionamiento equilibrado del organismo.

Se conocen numerosas sustancias, producidas por distintos tejidos, que estimulan o modifican la proliferación celular. Un grupo importante de esas sustancias está representado por los llamados *factores de crecimiento*, todos ellos de naturaleza proteínica. Los factores de crecimiento pueden llegar a la circulación y ser vehiculizados para ejercer su actividad a distancia (acción endocrina), ser secretados al espacio extracelular e influir sobre células vecinas (acción paracrina), o unirse a receptores en la misma célula que los produce (acción autocrina).

Sus receptores en la membrana plasmática son del tipo tirosina quinasa. Emiten señales al interior de la célula diana que modifican la actividad de transcripción génica.

Se presentan algunos de esos factores.

Factor de crecimiento de nervios (NGF, de *nerve growth factor*). Es un homodímero de polipéptidos de 118 aminoácidos y 13.259 Da. Pertenece a la familia de *neurotrofinas*, entre las cuales se cuentan, además de NGF, el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y las neurotrofinas 3 y 4/5, generadas a partir de precursores de unos 250 aminoácidos.

Actúa a través de receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca designados con las siglas Trk que activan la fosfolipasa Cγ (PLCγ), la fosfato inositol-3 quinasa (PI3K) y la proteína adaptadora Shc. Pone en marcha varias vías de señales, principalmente la Ras-MAPK.

Transmite información, por transporte axónico retrógrado, desde los órganos terminales inervados hacia los cuerpos celulares. Es curioso que la glándula submaxilar del ratón sea rica en esta sustancia; no se conoce su papel específico en ese tejido.

Estimula la división y diferenciación de neuronas simpáticas y sensoriales en embriones. Activa el crecimiento de neuritas y tiene efecto antiapoptótico neuronal.

Factores de crecimiento de fibroblastos (FGF). Son polipéptidos de unos 146 aminoácidos. En realidad constituyen una familia de citoquinas (ver pág. 687) importantes en la regulación de la proliferación y diferenciación de distintos linajes celulares. Participan en el desarrollo de tejido óseo y del sistema nervioso.

Hay al menos siete FGF; actúan como factores paracrinos o autocrinos uniéndose a receptores de membrana plasmática; se conocen cuatro tipos de estos receptores, con diferente distribución tisular (FGFR1, a FGFR4).

La *acondroplasia* es un tipo de enanismo causado por un defecto genético en el receptor FGFR3, relacionado con el control del crecimiento de condrocitos en cartílagos de crecimiento de huesos.

Existen mutaciones en los receptores FGFR1, FGFR2 y FGFR3 que producen *craneosinostosis*, cuadro caracterizado por cierre prematuro de las suturas del cráneo.

Factor de crecimiento epidérmico (EGF, de *epidermal growth factor*). Es un polipéptido formado por 53 restos aminoacídicos (6.045 Da) con tres puentes disulfuro intracatenarios. Como el NGF, se encuentra en concentración relativamente importante en la glándula submaxilar del ratón macho. En el hombre se lo ha aislado en orina.

Hace años se había encontrado en orina humana una proteína llamada β-*urogastrona*, con actividad inhibitoria de la secreción gástrica. Al parecer, la β-urogastrona y el EGF son la misma sustancia. El EGF se forma por ruptura de una proteína precursora de 1.168 residuos. Debido a su gran tamaño, se cree que esta molécula debe dar origen a más de un polipéptido activo, como es el caso de la preproopiomelanocortina.

El factor de crecimiento epidérmico se une a un receptor en membrana plasmática de las células blanco, el cual es una proteína integral de membrana de 170 kDa. Su porción externa comprende el segmento N-terminal de la molécula y tiene el sitio de unión de EGF, mientras el dominio intracitoplasmático corresponde al extremo C-terminal y posee el sitio catalítico de proteína-tirosina quinasa. A semejanza de la insulina, la unión del factor de crecimiento al receptor produce un cambio que cataliza la fosforilación de restos tirosina en el propio receptor (autofosforilación) y en otras proteínas.

Estimula la multiplicación de diversos tipos de células epiteliales. También activa la expresión de los protooncogenes Myc, Fos y Jun.

Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, de *platelet derived growth factor*). Es una glicoproteína resistente al calentamiento, formada por dos subunidades homólogas, A de 125 y B de 160 aminoácidos, unidas por puentes disulfuro. Se encuentra en los gránulos α de pla-

quetas y se libera al suero durante la coagulación de la sangre, razón por la cual se encuentra en el suero y no en el plasma. Se lo detecta en extractos de plaquetas.

La unión de PDGF a su receptor activa una proteína-tirosina quinasa, que fosforila al propio receptor en su dominio intracitoplasmático y a otras proteínas. El receptor tiene una masa aproximada de 170 kDa. El complejo PDGF-receptor es internado por endocitosis y degradado en la célula.

Es un poderoso mitógeno; estimula la multiplicación de queratinocitos, fibroblastos, células gliales, monocitos, neutrófilos y células musculares lisas. Favorece la división celular durante la cicatrización de heridas. Es el principal factor de crecimiento en el suero humano.

Otros factores de crecimiento. Existe un conjunto de polipéptidos que estimulan la división y diferenciación de células pluripotentes de la médula ósea. Algunos de esos factores serán tratados en las páginas 683 a 686, en la sección de citoquinas.

El factor de crecimiento hematopoyético o *eritropoyetina*, relacionado con la división y maduración de precursores de glóbulos rojos y los factores de crecimiento similares a insulina IGF-I e IFG-II han sido considerados en págs. 518 y 519 respectivamente.

El mecanismo de acción de EGF, PDGF y otros factores mencionados al tratar hormona de crecimiento (somatomedinas, IGF-I e IGF-II) tiene grandes similitudes con el de la insulina. También hay notable homología entre los receptores de estos factores; pertenecen a una familia de proteínas cuyos genes derivan de uno ancestral común.

Existe estrecha relación entre algunos oncogenes y genes que codifican factores de crecimiento y sus receptores. Así se explica la propiedad de aquéllos de modificar la capacidad proliferativa de células.

INTERMEDIARIOS QUÍMICOS DEL SISTEMA NERVIOSO

Neurotransmisores

El impulso nervioso es transmitido a través de la sinapsis por intermediarios químicos o neurotransmisores liberados en el terminal axónico de la neurona presináptica. Desde el espacio sináptico el neurotransmisor se dirige a su receptor en la neurona postsináptica, o en otro tipo de célula, en la cual provoca una respuesta específica.

Para ser considerado neurotransmisor un compuesto debe: 1. Ser sintetizado en la neurona. 2. Encontrarse en el terminal presináptico y ser liberado en cantidades suficientes para ejercer una acción determinada. 3. Reproducir los efectos del neurotransmisor endógeno cuando se lo administra como fármaco en concentraciones adecuadas. 4. Disponer de un mecanismo de degradación que lo elimine rápidamente del espacio sináptico.

La última condición es indispensable para la normal transmisión del impulso nervioso, que no sería posible si el intermediario químico persistiera por tiempos prolongados. La inactivación se realiza por hidrólisis o modificación química del transmisor en el mismo espacio sináptico o por captación a través de la membrana presináptica.

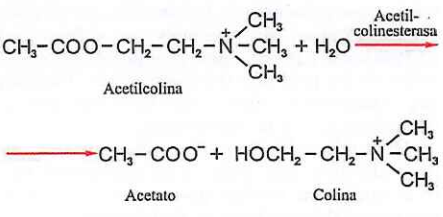
Según el tamaño de su molécula se distinguen dos tipos de neurotransmisores: los de pequeña masa y los de naturaleza peptídica.

Neurotransmisores de molécula pequeña. Los compuestos de bajo peso molecular aceptados como transmisores son la acetilcolina, los aminoácidos glicina, glutamato y γ-aminobutirato y las aminas biógenas (derivadas de aminoácidos) dopamina, noradrenalina, adrenalina, serotonina e histamina. También se incluye como neurotransmisores al ATP y derivados (adenosina, adenina).

Acetilcolina. Se almacena en vesículas sinápticas y también en el citoplasma de los terminales axónicos de neuronas colinérgicas. En presencia de iones Ca^{2+} es liberada hacia el espacio sináptico y promueve la despolarización en la célula siguiente al fijarse a sus receptores.

Es utilizada como transmisor por las neuronas motoras de médula espinal, las neuronas preganglionares del sistema nervioso autónomo y las posganglionares del sistema parasimpático. También es liberada en numerosas sinapsis del cerebro.

La degradación de la acetilcolina se produce *in situ* por acción de *acetilcolinesterasa*, enzima que cataliza la hidrólisis para producir colina y acetato:



Las sustancias que inhiben la colinesterasa prolongan la acción del neurotransmisor y refuerzan la respuesta. Existen inhibidores que actúan

sobre acetilcolinesterasa en forma reversible (ej.: eserina y neostigmina) y otros que se comportan como inhibidores irreversibles. Entre estos últimos se cuentan compuestos organofosforados, algunos de ellos utilizados como insecticidas.

La neurona presináptica debe recomponer su reserva de neurotransmisor, y para ello sintetiza acetilcolina. Esto se realiza por transferencia de acetato de acetil-CoA a una molécula de colina, catalizada por *colina-aceriltransferasa*, también llamada *colinoacetilasa*.

Catecolaminas. Los neurotransmisores de los sistemas dopaminérgico y adrenérgico (dopamina, adrenalina o epinefrina, y noradrenalina o norepinefrina) se sintetizan a partir de tirosina (pág. 346).

La dopamina es liberada principalmente por neuronas del mesencéfalo y diencéfalo. En el sistema nervioso central la noradrenalina es producida por neuronas del núcleo cerúleo que se proyectan hacia corteza cerebral, cerebelo y médula espinal. La noradrenalina es también el transmisor de neuronas posganglionares del sistema nervioso simpático. En algunas neuronas del cerebro se ha detectado liberación de adrenalina.

Las catecolaminas son captadas desde el espacio sináptico por transporte activo e inactivadas en la neurona en un proceso en el cual participan *monoamino oxidasa* (MAO) y *catecol-ortometiltransferasa* (COMT) (pág. 535). Sustancias que inhiben la captación, como cocaína y anfetaminas, potencian las respuestas inducidas por catecolaminas.

Serotonina. Es la 5-hidroxitriptamina, sintetizada a partir de triptófano (pág. 348).

Se libera en los terminales sinápticos de neuronas en núcleos del rafe medio que se proyectan a todo el cerebro y a médula espinal. Es inactivada por monoamino oxidasa (MAO). El producto final de su metabolismo es el ácido-5-OH-indolacético (5-HIA).

Serotonina, dopamina y noradrenalina están relacionadas con mecanismos cuya alteración produce cuadros patológicos serios. Los estados depresivos mejoran con la administración de fármacos que aumentan la transmisión en sinapsis serotoninérgicas. En pacientes con enfermedad de Parkinson hay deficiente producción de transmisor en las neuronas dopaminérgicas. También hay evidencias de alteraciones en la transmisión dopaminérgica en la esquizofrenia.

Histamina. Producto de la descarboxilación de la histidina (pág. 342), es un neurotransmisor en invertebrados, también demostrado como tal en neuronas del hipotálamo de vertebrados.

Aminoácidos. El ácido γ-aminobutírico y la glicina inhiben la transmisión del estímulo nervioso, pues causan hiperpolarización o despolarización parcial. El ácido γ-aminobutírico (GABA) es el principal transmisor en neuronas inhibitorias de cerebro y médula espinal. También se lo encuentra en células "en canasta" y de Purkinje del cerebelo, células granulosas del bulbo olfatorio y amacrinas de la retina. Se produce por descarboxilación de glutamato. Fármacos como las benzodiazepinas ejercen su acción depresora sobre el SNC modulando el complejo GABA-receptor y también desplazando un inhibidor endógeno del mismo. El baclofeno, relajante muscular, produce liberación de GABA.

La glicina es un neurotransmisor inhibitorio en la médula espinal. El glutamato es excitatorio, produce despolarización.

Purinas. En algunas neuronas el ATP, adenosina y adenina actúan como transmisores. Se han detectado neuronas purinérgicas en el sistema simpático (inervan miocardio, músculo liso de intestino, vasos deferentes) y en ganglios dorsales.

Las vesículas de los terminales sinápticos de esas neuronas son más ricas en ATP que las de otras. Los transmisores purinérgicos sólo tienen acción cuando las células posganglionares tienen receptores específicos.

Neuropéptidos. En el SNC se han aislado péptidos que muestran intensa actividad fisiológica. Los factores reguladores del hipotálamo (pág. 512) son ejemplos de este tipo de sustancias. A diferencia de los neurotransmisores de molécula pequeña hasta aquí considerados, que se sintetizan en toda la extensión del citoplasma, incluido el terminal sináptico, los neuropéptidos se producen en el cuerpo neuronal, son procesados en retículo endoplásmico y aparato de Golgi y finalmente encerrados como gránulos secretorios en vesículas que se desplazan por transporte axonal hacia los terminales. Inmediatamente después de liberados en el espacio sináptico son degradados por hidrólisis catalizada por serina proteasas.

Se han descripto más de cincuenta péptidos activos en células nerviosas. Algunos de ellos habían sido identificados como hormonas con acción fuera del cerebro (ej.: oxitocina, vasopresina, somatostatina, factores liberadores del hipotálamo, hormonas peptídicas de la hipófisis), otros fueron descriptos inicialmente como hormonas de origen no nervioso (ej.: gastrina, galanina, polipéptido vasoactivo intestinal, glucagón, secretina, péptido natriurético atrial, angiotensina, péptidos relacionados con el gen de calcitonina), pero se ha comprobado que muchos de ellos actúan también como neurotransmisores. Se mencionarán sólo algunos, otros han sido presen-

tados como hormonas gastrointestinales porque también son producidos en el tracto digestivo.

Sustancia P. Es un péptido formado por 11 aminoácidos (Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH_2) que desempeña el papel de neurotransmisor en vías sensitivas. Está relacionado con la transmisión de la sensación de dolor.

Opioides endógenos. Constituyen un grupo de sustancias de acción semejante a la de morfina. La existencia de estas sustancias producidas en el sistema nervioso pudo preverse por el hallazgo de receptores para morfina y otras drogas similares. Actualmente se conocen tres familias de péptidos opioides: endorfinas, encefalinas y dinorfinas, aisladas de sistema nervioso central. Actúan como neuromoduladores. Por ejemplo, en las neuronas que conducen la sensación de dolor, inhiben la liberación de sustancia P, lo cual produce un efecto analgésico. Poseen también otras acciones sobre el comportamiento, apetito y sistema endocrino.

Endorfinas. El principal representante es la β-endorfina, péptido de 31 aminoácidos generado por ruptura de la proopiomelanocortina, molécula precursora que da también origen a ACTH, α-MSH y lipotropina (pág. 514).

Encefalinas. Se descubrieron dos pentapéptidos, llamados metionina-encefalina o *metencefalina*, cuya secuencia es Tyr-Gly-Gly-Phe-Met, y leucina-encefalina o *leuencefalina*, que difiere de la metencefalina por tener leucina en lugar de metionina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu). Ambas derivan de la misma molécula, la *preproencefalina*, cuyos primeros 20 a 25 aminoácidos corresponden al péptido señal, que se separa para dejar proencefalina, de la cual se originan metencefalina, leuencefalina y un péptido de 25 aminoácidos con actividad opioide, el péptido E.

Dinorfinas. Se originan de una molécula precursora, la *preprodinorfina*, que al perder el péptido señal se convierte en *prodinorfina*; ésta genera varios productos, entre ellos la *dinorfina*, un péptido de 17 aminoácidos, y *α-neoendorfina*. La dinorfina es el péptido más potente del grupo de opiáceos endógenos; su acción analgésica es unas 50 veces mayor que la de β-endorfina, 200 veces superior a la de morfina y unas 700 veces más intensa que la de leuencefalina.

Otros transmisores. Óxido nítrico (NO). Es una sustancia tóxica. Tiene estructura de radical libre, con un electrón extra que le otorga gran reactividad química. Es un compuesto lábil, cuya duración en el organismo no excede de 6 a 8 segundos, fácilmente convertido en nitratos y nitritos. A pesar de estas propiedades, aparentemente no compatibles con el ejercicio de funciones fisiológicas importantes, numerosas evidencias indicaron que el NO participa como mensajero químico en el sistema nervioso y en otros tejidos.

En diversas células, entre ellas neuronas de algunas regiones del cerebro y cerebelo, se ha demostrado la existencia de *óxido nítrico sintasa*, que cataliza la conversión de arginina en óxido nítrico y citrulina. La enzima es una flavoproteína con FMN y FAD, requiere oxígeno molecular y NADPH y es activada por Ca^{2+}-calmodulina (pág. 502).

El NO se une al hierro del hemo de guanilato ciclasa y la capacita para convertir GTP en GMP cíclico. Este último compuesto es el segundo mensajero del sistema de señales, que activa una proteína quinasa.

Si bien el óxido nítrico no es un neurotransmisor en el sentido clásico, se comporta como importante modulador en algunas sinapsis del SNC.

Uno de los neurotransmisores excitatorios de numerosas neuronas del sistema nervioso central es el glutamato. El mejor conocido de los receptores de glutamato es el llamado NMDA (de N-metil-D-aspartato, agonista selectivo de este tipo de receptor). Al fijarse glutamato a receptores NMDA, abre canales de Ca^{2+}. El ion penetra en la neurona postsináptica, en cuyo interior se une a calmodulina y activa la óxido nítrico sintasa. El NO producido es un intermediario más en la transmisión del estímulo.

También se ha propuesto al óxido nítrico como mediador químico en procesos de memoria y aprendizaje. La facilidad con la cual la pequeña molécula del NO atraviesa membranas celulares le permitiría actuar como eficiente "mensajero retrógrado" en el fenómeno de potenciación a largo plazo, considerado el principal mecanismo de almacenamiento de memoria.

En lòs accidentes cerebrovasculares, la hipoxia produce una descarga exagerada de glutamato en neuronas del cerebro y, en consecuencia, gran aumento en la generación de NO, el cual se difunde al exterior de la neurona de origen y ejerce efectos tóxicos sobre células vecinas. Se cree que el daño cerebral en esos casos se debe predominantemente al óxido nítrico, cuya acción nociva se acentúa al actuar sobre células estresadas por la hipoxia. Ello ha llevado a proponer el uso temprano de inhibidores de óxido nítrico sintasa, o de bloqueantes de receptores NMDA, para prevenir el daño en los accidentes cerebrovasculares.

El NO también interviene como "segundo mensajero" en procesos que determinan vasodilatación. La acetilcolina liberada por terminales nerviosos en vasos sanguíneos se fija a receptores localizados en células del endotelio, activa la óxido nítrico sintasa existente en esas células y gene-

ra NO, el cual difunde a través de las membranas celulares, penetra en las fibras musculares lisas adyacentes y provoca su relajación. Ahora se reconoce que diversos nitratos orgánicos utilizados desde hace mucho tiempo como vasodilatadores coronarios, deben su acción al óxido nítrico que producen al ser metabolizados en el organismo.

Otras células fuera del sistema nervioso poseen óxido nítrico sintasa y, por lo tanto, están capacitadas para producir NO. Entre esas células se hallan los macrófagos, que actúan en los procesos inflamatorios desencadenados con el fin de eliminar elementos extraños ingresados en el organismo. Los macrófagos activados por distintos factores producen óxido nítrico que difunde en su entorno y provoca, como radical libre fuertemente oxidante, la destrucción de células tumorales, bacterias, hongos y otros agentes invasores.

Monóxido de carbono. Es otro gas tóxico producido en la reacción catalizada por la *hemoxigenasa* (pág. 361). Probablemente el CO ejerce en el SNC acciones similares a las del NO. Ambos activan a la guanilato ciclasa y elevan el nivel de GMPc.

RESUMEN

Las hormonas, factores de crecimiento, citoquinas y neurotransmisores, son mediadores químicos en sistemas biológicos de comunicación e integración. Por su naturaleza química, las hormonas se clasifican en: 1. *Esteroides* (derivados de ciclopentanoperhidrofenantreno). 2. *Derivados de aminoácidos*. 3. *Eicosanoides* (derivados de ácidos grasos poliinsaturados). 4. *Péptidos*. 5. *Proteínas*. **Acciones.** Las hormonas pueden actuar sobre la actividad de: 1. Sistemas de transporte de membrana. 2. Enzimas presentes en la célula. 3. Síntesis de proteínas. **Propiedades.** Las hormonas (H) actúan en concentraciones muy pequeñas; tienen una vida media de segundos a días; su secreción responde a estímulos del ambiente y puede presentar variaciones cíclicas; tienen gran especificidad, debida a la presencia de receptores (R). La formación del complejo HR semeja la del complejo enzima-sustrato: adaptación inducida, saturabilidad y reversibilidad.

HIPÓFISIS. Hormonas reguladoras (hipotálamo). Existen factores estimulantes de la secreción de todas las hormonas producidas en hipófisis y factores inhibitorios para las hormonas de crecimiento, melanocitoestimulante y prolactina. *1. Liberadora de corticotrofina (CRH)*: péptido de 41 aminoácidos. *2. Liberadora de tirotrofina (TRH)*: tripéptido. *3. Liberadora de hormonas luteinizante y foliculoestimulante (LHRH y FSHRH)*: decapéptido. *4 y 5. Reguladoras de prolactina*: una liberadora (PRRH) y otra inhibidora (PRIH), son péptidos pequeños. *6 y 7. Reguladoras de hormona de crecimiento*: una liberadora (GHRH) y otra inhibidora (GHIH), también llamada *somatostatina*, péptido de 14 aminoácidos. *8 y 9. Reguladoras de hormona melanocitoestimulante*: liberadora (MSRH) e inhibidora (MSIH), péptidos pequeños.

Hormonas de la adenohipófisis. *1. Adrenocorticotrófica* (ACTH): polipéptido de 39 aminoácidos (4.500 Da); los primeros 23 aminoácidos son los responsables de la actividad biológica. Se origina a partir de una proteína precursora de 280 aminoácidos, la preproopiomelanocortina, de la cual se generan, además, α-MSH, β-MSH, γ-MSH, γ-lipotropina, β-endorfina, α-endorfina y metencefalina. ACTH estimula la síntesis de hormonas en corteza suprarrenal, principalmente glucocorticoides. *2. Tiroestimulante* (TSH): glicoproteína de 30 kDa, formada por cadenas α y β. La especificidad reside en la subunidad β. Activa la síntesis y liberación de hormonas tiroideas (T_3 y T_4). *3. Gonadotrofinas*: *foliculoestimulante* (FSH) y *luteinizante* (LH): glicoproteínas formadas por subunidades α y β. La β es específica. FSH induce maduración y desarrollo del folículo de de Graaf en ovario. Junto con LH estimula la producción de estrógenos. Promueve desarrollo de túbulos seminíferos en testículo. LH controla el desarrollo del cuerpo lúteo en ovario, la secreción de estrógenos y progesterona. En testículo estimula la producción de testosterona. *4. Lactogénica o prolactina* (PR): proteína simple. Estimula la formación del cuerpo lúteo y la producción de progesterona. Promueve el desarrollo de la glándula mamaria. *5. Melanocitoestimulante* (MSH): tres péptidos (α, β y γ) derivados de preproopiomelanocortina. *6. Somatotrofina* u *hormona de crecimiento* (GH): proteína simple de 191 aminoácidos. Estimula la síntesis de proteínas, disminuye la lipogénesis, activa la lipólisis. Deprime el transporte de glucosa en el músculo y la utilización de glucosa; aumenta la gluconeogénesis; es hiperglucemiante. *Somatomedinas o factores de crecimiento semejantes a insulina* (*IGF*): producidos en el hígado por acción de la GH. Estimulan la incorporación de sulfato y glucosamina a proteoglicanos de cartílago, aumentan la actividad mitótica en fibroblastos, remedan la acción de la insulina en músculo y tejido adiposo.

Hormonas de la neurohipófisis. *1. Oxitocina*: nonapéptido; estimula la contracción del útero. *2. Vasopresina* u *hormona antidiurética*: nonapéptido, difiere de la oxitocina en 2 aminoácidos; efecto presor y reabsorción de agua en tubos colectores de riñón.

TIROIDES. Produce tiroxina (3,5,3',5'-tetrayodotironina o T_4) y 3,5,3'-triyodotironina (T_3). Los yoduros captados de la sangre son activados por una peroxidasa tiroidea. En la luz de los folículos se secreta apotiroglobulina. La misma peroxidasa une el yodo activado a posiciones 3 y 5 de restos tirosina de la apotiroglobulina (organificación) y se forman MIT y DIT. Éstos se acoplan a restos DIT para dar T_3 o T_4. Después de la yodación, la apotiroglobulina se convierte en tiroglobulina, que ingresa en la célula por endocitosis. En el fagolisosoma se liberan T_4, T_3, DIT y MIT; las últimas son desyodadas por selenoenzimas. T_3 y T_4 pasan a la circulación. En la sangre se transportan unidas a proteínas específicas (TGB y transtirretina). En el hígado son conjugadas con glucuronato y sulfato y excretadas por la bilis o desaminadas y descarboxiladas para dar Tetrac y Triac. T_3 y T_4 se unen a receptores nucleares que se fijan a elementos de respuesta en el ADN. *Acciones*: estimulan la síntesis de ARN y proteínas; aumentan la actividad de Na^+,K^+-ATPasa; incrementan el consumo de oxígeno y promueven la utilización de glucosa, lípidos y aminoácidos. En general, aceleran los recambios metabólicos. A concentraciones fisiológicas tienen efecto anabólico. En dosis elevadas tienen acción catabólica. T_3 y T_4 también ejercen acciones no genómicas.

CORTEZA SUPRARRENAL. Glucocorticoides (cortisol-cortisona). **Mineralocorticoides** (aldosterona-desoxicorticosterona). **Corticoides androgénicos** (androstenediona-deshidroepiandrosterona). Todos se sintetizan a partir de colesterol. Los corticosteroides son transportados en la sangre unidos a proteínas plasmáticas, principalmente transcortina y albúmina.

La fracción de hormona que queda libre es la biológicamente activa y está en equilibrio con la ligada a proteína. Los corticoides son rápidamente eliminados, principalmente por el hígado, que los vierte en la bilis; se reabsorben en el intestino y se excretan en su mayor parte por vía urinaria. A partir de esteroides androgénicos se forman 17-cetoesteroides. ACTH estimula la síntesis y secreción de corticoides, preferentemente glucocorticoides; la producción de aldosterona es estimulada por angiotensina II. Los corticosteroides se unen a receptores en el núcleo (o citoplasma). El complejo HR en el núcleo se une a elementos de respuesta en el ADN, desde donde modula la transcripción. *Acciones*: *Glucocorticoides*: En tejidos extrahepáticos disminuyen la utilización de glucosa y estimulan la degradación de proteínas. En tejido adiposo activan la lipólisis, deprimen la síntesis de triacilgliceroles. En hígado activan la gluconeogénesis a partir de aminoácidos; aumentan la síntesis de proteínas, especialmente enzimas. Tienden a aumentar la glucemia y la reserva de glucógeno; incrementan los ácidos grasos libres y aminoácidos en sangre circulante. Acción antiinflamatoria y depresora de respuestas inmunitarias. *Mineralocorticoides*: aumentan la reabsorción de Na^+ y Cl^- y excreción de K^+ en túbulos renales. *Corticoides androgénicos*: efecto anabólico sobre proteínas. Acciones no genómicas: aldosterona aumenta la concentración de Ca^{2+} intracelular.

MÉDULA ADRENAL. Produce *adrenalina* o *epinefrina* y *noradrenalina* o *norepinefrina*, ambas derivadas de tirosina. Se inactivan por *monoaminooxidasa* y *catecol-O-metil-transferasa*. Los metabolitos se excretan por orina; los más importantes son ácido vanilmandélico y metanefrina. La noradrenalina y adrenalina se unen a receptores en la membrana plasmática: los α_1 se asocian a proteína G_q del sistema de PIP_2; los α_2 se acoplan a proteína G_i e inhiben la adenilato ciclasa; los β_1 y β_2 interactúan con proteínas G_s. *Acciones*: estimulan la glucogenólisis e inhiben la glucogenogénesis; aumentan la gluconeogénesis; hiperglucemiantes. Tienden a preparar al organismo para enfrentar situaciones de emergencia (lucha y huida).

PÁNCREAS. Insulina. Proteína de 6.000 Da formada por una cadena A (21 aminoácidos) y otra B (30 aminoácidos) unidas por dos puentes disulfuro. Es sintetizada como preproinsulina, que pierde el péptido líder y se convierte en proinsulina. La eliminación de un péptido de conexión (péptido C) de 30 aminoácidos genera insulina activa. El estímulo más eficaz para la secreción de insulina es el aumento de concentración de glucosa en sangre. La hormona se une a receptores de membrana plasmática. El receptor es una glicoproteína tetramérica (dos subunidades α y dos β). La subunidad α fija insulina, lo cual activa la proteína-tirosina quinasa en el dominio citosólico de la subunidad β que se autofosforila y fosforila otras proteínas en el citosol. Entre éstas las más importantes son los *sustratos del receptor de insulina* (IRS), que ponen en marcha diversas vías de señales. Una de ellas se inicia con la activación de fosfoinositol-3-quinasa, que forma $PI(3,4,5)P_3$ y activa la *proteína quinasa B* o *Akt*. También tiene relación con la activación del sistema Ras-MAP quinasas. *Acciones*: estimula el ingreso de glucosa por traslado de GLUT4 a la membrana plasmática, y también el de aminoácidos, nucleósidos y fosfato en las células. Activa todas las vías de utilización de glucosa; produce activación directa de enzimas y estimulación de su síntesis, deprime la gluconeogénesis; es hipoglucemiante. Estimula la síntesis de ácidos grasos y triacilgliceroles; reduce la lipólisis en tejido adiposo; activa la síntesis de ARN y proteínas. Incrementa la actividad Na^+,K^+-ATPasa.

Glucagón. Polipéptido de 29 aminácidos. Su secreción es estimulada por disminución de la glucemia. Se une a receptores en la membrana y activa la adenilato ciclasa. *Acciones*: en hepatocitos promueve la glucogenólisis y reprime la glucogenogénesis; incrementa la gluconeogénesis. En adipocitos activa la lipasa y promueve la liberación de ácidos grasos. Estimula el catabolismo nitrogenado.

TESTÍCULO. La principal hormona es la *testosterona* (esteroide), convertida en *dihidrotestosterona*, más activa. Los metabolitos principales son androsterona y etiocolanolona, que forman parte de los 17-cetoesteroides urinarios. Favorece el desarrollo de los órganos reproductivos, glándulas accesorias y caracteres sexuales secundarios. Estimula el anabolismo proteico.

OVARIO. Hormonas estrogénicas (estradiol y estrona). Tienen acción anabólica en los órganos genitales femeninos; aumentan la captación de agua, electrólitos, aminoácidos y glucosa por células del miometrio. **Hormona progestacional** (progesterona). Produce movilización de proteínas tisulares y su utilización con fines gluconeogénicos. En general, los esteroides se unen a receptores nucleares y activan la transcripción y la síntesis de proteínas específicas. El ovario produce también relaxina, inhibina, activina y folistastina.

PARATIROIDES. Hormona paratiroidea. Proteína de 84 aminoácidos; la actividad biológica reside en el segmento formado por los primeros 34 aminoácidos. Sintetizada como preprohormona. El principal estímulo para la secreción es la disminución de Ca^{2+} circulante. La hormona se une al receptor de membrana y estimula la adenilato ciclasa. *Acciones*: en hueso promueve la liberación de Ca^+ y estimula la actividad de osteoclastos, activa en ellos la síntesis de ARN y proteínas; intensifica la disolución mineral del hueso. En osteocitos activa la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico. Activa la Ca^{2+}-ATPasa. Aumenta el pasaje de Ca^{2+} desde el hueso al líquido extracelular. En riñón promueve la reabsorción de Ca^{2+} y eliminación de fosfatos en los túbulos distales del nefrón. También aumenta la eliminación urinaria de Na^+, K^+, citrato y bicarbonato y disminuye la de H^+ y NH_4^+; activa la formación de $1,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$.

Calcitonina. Sintetizada y secretada por las células C de tiroides. Péptido de 32 aminoácidos. Se une al receptor de membrana y aumenta el nivel de AMPc en la célula efectora. Produce rápida disminución de niveles de Ca^{2+} y fosfato en sangre.

RIÑÓN. Produce varios agentes hormonales. **Renina.** Secretada por el aparato yuxtaglomerular como preprorrenina inactiva cuando disminuye la presión arterial, el flujo sanguíneo renal o la concentración de Na^+ en líquido tubular. Por hidrólisis del precursor se forma *renina*, proteasa que es liberada. En el plasma la renina actúa sobre *angiotensinógeno*, del cual separa un decapéptido, la *angiotensina I*, inactiva. La *enzima convertidora de angiotensina* corta dos aminoácidos y genera el octapéptido *angiotensina II*. Ésta se une a receptores en las células blanco (AT1 y AT2). Los AT1 están acoplados a proteínas G_q. El efecto general es contracción arteriolar, aumento de presión arterial, retención de Na^+ y agua, también estimula la secreción de aldosterona en corteza adrenal. **Eritropoyetina.** Su secreción es estimulada por la reducción de la tensión de O_2 en riñones. Se une a un receptor asociado a tirosina quinasa. Estimula la actividad mitótica y diferenciación de células eritropoyéticas. Aumenta el número de glóbulos rojos circulantes y la capacidad de transporte de O_2. **Calcitriol.** En riñón se produce $1,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$, metabolito activo de la vitamina D. **Bradiquinina.** Vasodilatador.

CORAZÓN. Factor natriurético atrial. Comprende una familia de péptidos de 24 a 28 aminoácidos. Se une a receptor de membrana, activa la guanilato ciclasa y aumenta el nivel de GMPc. Inhibe la secreción de renina; estimula la excreción de agua y Na^+; disminuye la reabsorción de Na^+ en los túbulos renales; relaja la musculatura lisa.

HORMONAS GASTROINTESTINALES. Son polipéptidos: gastrina, secretina, colecistoquinina, péptido intestinal vasoactivo, enteroglucagón y otros.

PINEAL. Melatonina. Indolamina derivada de triptófano. Liberada durante el período de oscuridad del ciclo diario. Sirve de señal interna de los ciclos luz-oscuridad en el ambiente y permite ajustar los ritmos circadianos.

EICOSANOIDES. *Prostaglandinas*, *tromboxano*, *prostaciclina* y *leucotrienos*: derivados de ácidos grasos poliinsaturados de 20 carbonos, principalmente araquidonato. Promueven muy diversas acciones.

FACTORES DE CRECIMIENTO. *Factor de crecimiento de nervios* (*NGF*). Homodímero de polipéptidos de 118 aminoácidos. Estimula la división y diferenciación de neuronas simpáticas y sensoriales en embriones. Activa el crecimiento de neuritas.

Factor de crecimiento epidermal (*EGF*). Polipéptido de 53 aminoácidos. Estimula la proliferación de diversas células epiteliales. Se forma por ruptura de un precursor de 1.168 aminoácidos. Se une a un receptor de membrana plasmática con actividad proteína-tirosina quinasa.

Factor de crecimiento derivado de plaquetas (*PDGF*). Formado por dos subunidades homólogas de 18 kDa cada una, unidas por puentes disulfuro. Es un poderoso mitógeno. Su unión al receptor específico activa una tirosina quinasa que fosforila al propio receptor y a otras proteínas.

Factor de crecimiento de fibroblastos (*FGF*). Polipéptido de unos 146 aminoácidos. Interviene en la regulación de la proliferación y diferenciación de diversos linajes celulares.

Factor de crecimiento eritropoyético. *Eritropoyetina*.

NEUROTRANSMISORES. En general son sustancias de masa pequeña (acetilcolina, aminas biógenas, aminoácidos, purinas) y péptidos. Los mecanismos que aseguran la rápida eliminación del neurotransmisor son la degradación enzimática en el mismo espacio sináptico o la captación por la neurona presináptica, que luego lo inactiva o lo reutiliza. *Acetilcolina*: es sintetizada en la propia neurona por la colina-acetiltransferasa (colino acetilasa). La degradación es producida por acetilcolina esterasa. *Catecolaminas*: dopamina, noradrenalina y adrenalina, se sintetizan a partir de tirosina. Después de su liberación en el espacio sináptico son captadas por la neurona presináptica e inactivadas (monoaminooxidasa, catecol-orto-metiltransferasa). *Serotonina*: sintetizada a partir del triptófano. Inactivada por monoaminooxidasa. *Aminoácidos*: el ácido γ-aminobutírico (GABA) y glicina son inhibidores de la transmisión; el glutamato es excitatorio. *Neuropéptidos*: *Sustancia P*: relacionada con la transmisión del dolor. *Opioides endógenos*: neuromoduladores; efecto analgésico. *Endorfinas*: la principal es la β-endorfina, de 31 aminoácidos, generada por ruptura de proopiomelanocortina. *Encefalinas*: dos pentapéptidos, metencefalina y leuencefalina. Ambas se originan de la preproencefalina. *Dinorfina*: es el más potente de los opiáceos endógenos.

BIBLIOGRAFÍA

Aramburo C., Alba-Betancourt C., Luna M., Harvey S. (2014). Expression and function of growth hormone in the nervous system: A brief review. *General and Comparative Endocrinology*, 203: 35-42.

Becker K.L. (2002). *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*, 3ra. Ed., J.P. Lippincott, Filadelfia.

Carter-Su C., Schwartz J., Smith L.S. (1996). Molecular mechanisms of growth hormona action. *Annual Reviews of Physiology*, 58: 187-207.

Cassone V.M. (1998). Melatonin: a role in vertebrate circadian rhymths. *Chronobiology International*, 15: 457-473.

Chew S.L., Leslie D. (2006). *Clinical Endocrinology and Diabetes*. Churchill Livingstone, Edinburgh.

Cohen S. (2008). Origins of growth factors: NGF and EGF. *The Journal of Biological Chemistry*, 283: 33793-33797.

Donangelo I. (2014). Thyroid hormone and central control of metabolic homeostasis. *Journal of Endocrinology. Diabetes, Obesity*, 2: 1047-1051.

Goffin V., Binart N., Touraine P., Kelly P.A. (2002). Prolactin: The new biology of an old hormone. *Annual Review of Physiology*, 64: 47-67.

Greenspan F.S., Gardner D.G. (2001). *Basic and Clinical Endocrinology*, 7ma. Ed., Lange Medical Books, McGraw-Hill, Nueva York.

Incerpi S. (2002). Actions of thyroid hormone on ion transport. *Current Opinion in Endocrinology and Diabetes*. 9: 381-386.

Jeong J.K. Kim G., Lee B.J. (2014). Participation of the central melanocortin system in metabolic regulation and energy homeostasis. *Cellular Molecular Life Sciences*, 71: 3799-3803.

Kronenberg H.M. (2008). *Williams Textbook of Endocrinology*. 11ma. Ed., Saunders Elsevier, Filadelfia.

Lusis A.J.,Attie A.D., Reve K. (2008). Metabolic syndrome: from epidemiology to system biology. *Nature Reviews Genetics*, 9: 819-830.

Mackensie R.W.A., Elliott B.T. (2014). AKt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes, metabolic syndrome and Obesity*, 7: 55-64.

Melmed S., Conn P.M. (Eds.) (2005). *Endocrinology: Basic and Clinical Principles*, 2da. Ed., Humana Press, Totowa, Nueva Jersey.

Muoio D.M., Newgard C.B. (2008). Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β-cell failure in type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9: 193-205.

Nef S., Parada L.F. (2015). Hormones in male sexual development. *Genes and Development*, 11: 3075-3086.

Nilsson S., Gustafsson J.A. (2002). Biological role of estrogen and estrogen receptors. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 37: 1-28.

Pearce D., Bhargava A., Cole T.J. (2003). Aldosterone: Its receptor, target genes and action. *Vitamins and Hormones*, 66: 29-76.

Ross S.A., Gulve E.A., Wang M. (2004). Chemistry and biochemistry of type 2 diabetes. *Chemical Reviews*, 104: 1255-1282.

Sato T., Nakamura Y., Shiimura Y., Ohgusu H., Kangawa K., Kojima M. (2012). Structure, regulation and function of ghrelin. *Journal of Biochemistry*, 151: 119-123.

Small C.J., Bloom S.R. (2004). Gut hormones and the control of appetite. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 15: 259-263.

Varman T.S., Shulman G.I. (2012). Mechanisms of insulin resistance. Common threads and missing links. *Cell*, 148: 852-871.

Weiss M.D. (2009). Proinsulin and the genetics of diabetes mellitus. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 19159-19165.

White M.F. (2003). Insulin signaling in health and disease. *Science*, 302: 1710-1711.

CAPÍTULO 27

Vitaminas

A fines del siglo XIX se sabía que los componentes de la dieta normal, es decir, aquella que aseguraba un buen estado de nutrición, eran proteínas, hidratos de carbono, lípidos, sales inorgánicas y agua. Se pensó entonces que sería posible reemplazar la dieta corriente por una mezcla formada por esos mismos compuestos purificados, añadidos en proporciones similares a las existentes en los alimentos naturales.

Estudios en animales de laboratorio a los cuales se les suministraba una dieta sintética preparada con proteínas, carbohidratos, grasas y minerales puros, agregados en cantidad y calidad idénticas a las encontradas en los alimentos, permitieron observar que, poco después de mantenerlos en este régimen, los animales presentaban alteraciones que aumentaban en gravedad hasta determinar la muerte. Estas experiencias indicaban que, además de los compuestos conocidos, los alimentos debían contener otras sustancias indispensables para el mantenimiento de la salud y de la vida, pero en concentraciones tan bajas que no podían ser detectadas con las técnicas utilizadas en esa época. Aunque no se tenía idea acerca de la naturaleza de esas sustancias, se predijo su existencia y se las llamó *factores nutritivos accesorios*.

A comienzos del siglo XX se aisló uno de esos factores; se trataba de una molécula con un grupo amina y se la llamó "amina vital" (*vital amine* en inglés). La contracción de *vital* y *amina* dio origen al nombre *vitamina*. Desde entonces se han descubierto muchos otros factores nutritivos accesorios. Si bien la mayoría no posee grupo amina, el uso ha impuesto la denominación vitamina para todos ellos.

Propiedades generales. a) Son compuestos orgánicos de estructura química variada, relativamente simples, distintos de hidratos de carbono, lípidos o proteínas.

b) Se encuentran en los alimentos naturales en concentraciones muy pequeñas.

c) Son esenciales para mantener la salud y el crecimiento normal.

d) No pueden ser sintetizados por el organismo; deben ser provistos por los alimentos.

e) Cuando no son aportados con la dieta o no son absorbidos en el intestino, se produce un cuadro patológico de carencia o *avitaminosis*.

Papel funcional. Las vitaminas no desempeñan funciones plásticas ni energéticas. Su notable actividad en concentraciones muy bajas asemeja su acción a la de catalizadores, hormonas y otros reguladores metabólicos. En efecto, muchas integran sistemas enzimáticos en carácter de componentes de coenzimas; otras cumplen su papel de modo similar al de las hormonas.

Nomenclatura. Inicialmente se reconoció la existencia de dos factores vitamínicos. Uno de ellos, soluble en lípidos y solventes orgánicos, fue llamado factor liposoluble A y más tarde vitamina A; el otro, de naturaleza polar, era el compuesto reconocido como "amina vital"; se lo denominó factor hidrosoluble B y luego vitamina B. Posteriormente se descubrieron otros factores, a los cuales se les asignaron las letras C, D y E, por orden de aparición. Una excepción a este orden alfabético es la vitamina K, cuyo nombre corresponde a la inicial de la función en la cual está comprometida (*Koagulation* en danés, idioma de su descubridor). El factor B resultó no ser un solo compuesto sino un conjunto de varios. A medida que se reconocían los distintos componentes de este grupo, se los designaba con subíndices nu-

méricos (B_1, B_2, B_3, ... B_{12}); la vitamina B original pasó a ser el "*complejo vitamínico B*".

Para algunas vitaminas se ha aislado más de un compuesto con actividad análoga. Sustancias diferentes con idénticas propiedades vitamínicas se denominan *vitámeros*.

Según sus características de solubilidad, las vitaminas se dividen en *liposolubles* e *hidrosolubles*.

Las liposolubles (A, D, E y K) se encuentran en la porción lipídica de los alimentos. En general, cuando se ingieren en exceso, se depositan en distintos tejidos, principalmente en el hígado, y se van eliminando muy lentamente. El consumo de estas vitaminas en cantidades superiores a los requerimientos normales durante tiempo prolongado puede tener efectos indeseables.

Las hidrosolubles incluyen todos los componentes del complejo B y la vitamina C. En general, no se almacenan y deben ser provistas en forma regular, cotidiana. Para la mayoría de ellas, dosis elevadas no producen efectos tóxicos porque el exceso se elimina con facilidad por orina.

Esta separación de los factores vitamínicos basada en su solubilidad se justifica desde el punto de vista nutricional. En los alimentos suelen encontrarse juntos factores del mismo grupo; es frecuente la producción de cuadros de deficiencia múltiple, que comprenden varias vitaminas con iguales características de solubilidad.

Provitaminas. Las vitaminas son provistas con los alimentos; algunas se encuentran en forma de precursores o *provitaminas*, compuestos que al ser metabolizados generan la vitamina correspondiente. Por ejemplo, pigmentos de origen vegetal llamados *carotenos* se comportan como provitamina A.

Antivitaminas. Son sustancias con estructura química semejante a la de la vitamina, que actúan como antagonistas metabólicos. Por su analogía estructural ocupan el lugar correspondiente a la vitamina en los sistemas enzimáticos o en los receptores y bloquean su acción.

Avitaminosis. Recibe este nombre el cuadro patológico producido por carencia de vitaminas. Para cada vitamina la deficiencia determina síntomas característicos. Las avitaminosis se producen por: a) *Mala alimentación*. La causa más común de hipo- o avitaminosis es la falta de alimentos frescos, variados y en cantidad adecuada. b) *Consumo exclusivo de alimentos conservados o cocidos a altas temperaturas*. La cocción en contacto con el aire inactiva algunas vitaminas. c) *Absorción deficiente en intestino*. d) *Aumento de los requerimientos vitamínicos*. Existen situaciones fisiológicas (embarazo, lactancia y etapas de crecimiento activo en el niño) o patológicas (hipertiroidismo y procesos febriles) en las cuales las necesidades de vitaminas están incrementadas y la ingesta normal no alcanza a satisfacerlas. e) *Excesos desequilibrados de la dieta*. La ingesta exagerada de carbohidratos aumenta los requerimientos de vitamina B_1. El consumo excesivo de alcohol interfiere la absorción de muchas vitaminas.

Tabla 27-1. Vitaminas: Aporte dietario recomendado (por día).

Grupos	A[a]	D[b]	E[c]	K[d]	B_1[e]	B_2[f]	B_3[g]	B_5[h]	B_6[i]	B_7[j]	B_9[k]	B_{12}[l]	C[m]
Niños													
0 a 6 meses	375	5	4	5	0,2	0,3	2	1,7	0,1	5	80	0,4	25
7 a 12 meses	400	5	5	10	0,3	0,4	4	1,8	0,3	6	80	0,7	30
1 a 3 años	400	5	6	15	0,5	0,5	6	2,0	0,5	8	150	0,9	30
4 a 6 años	450	5	7	20	0,6	0,6	8	3,0	0,6	12	200	1,2	30
7 a 9 años	500	5	11	25	0,9	0,9	12	4,0	1,0	20	300	1,8	35
Adolesc.													
10 a 18 años	600	5	15	45	1,2	1,2	16	5,0	1,3	25	400	2,4	40
Adultos													
Mujeres													
19 a 65 años	500	10	15	55	1,1	1,1	14	5,0	1,3	30	400	2,4	45
>65 años	600	15	15	55	1,1	1,1	14	5,0	1,5	30	400	2,4	45
Embarazadas	800	5	15	55	1,4	1,4	18	6,0	1,9	30	600	2,6	55
Lactantes	1.300	5	19	55	1,5	1,6	17	7,0	2,0	35	500	2,8	70
Varones													
19 a 65 años	600	10	15	65	1,2	1,3	16	5,0	1,3	30	400	2,4	45
>65 años	600	15	15	65	1,2	1,3	16	5,0	1,7	30	400	2,4	45

[a]. En equivalentes de actividad de retinol. [b]. En µg de calciferol. [c]. En mg de equivalentes de α-tocoferol. [d]. En µg de filoquinona. [e]. B_1-Tiamina, en mg. [f]. B_2- Riboflavina, en mg. [g]. B_3- Niacina, en mg. [h]. B_5- Ácido pantoténico, en mg. [i]. B_6- Piridoxina, en mg. [j]. B_7- Biotina, en µg. [k]. B_9- Ácido fólico, en µg. [l]: B_{12}- Cobalamina, en µg. [m]. C- Ácido ascórbico, en mg.

Requerimiento de vitaminas. Una persona normal debe recibir con su dieta todas y cada una de las vitaminas en la cantidad necesaria para mantener el estado de salud y evitar los trastornos que pueden causar tanto la deficiencia como el exceso. Desde el punto de vista nutricional se tiene en cuenta la *biodisponibilidad* de la vitamina, es decir, el porcentaje de la cantidad presente en los alimentos efectivamente incorporado.

Los datos disponibles hasta el presente permiten dar valores de la ingesta aconsejable para cada vitamina, los que varían con el sexo, la edad y situaciones fisiológicas como embarazo o lactancia.

Requerimiento promedio estimado (RPE) (en inglés EAR, *estimated average requirement*). Es el menor aporte diario que, mantenido durante tiempo prolongado, previene la aparición de síntomas de deficiencia.

Aporte dietario recomendado (ADR) (en inglés RDA, *recommended dietary allowance*). Es la ingesta diaria suficiente para satisfacer las necesidades de prácticamente la totalidad de los individuos aparentemente sanos.

Los valores de ADR para todas las vitaminas se muestran en la Tabla 27-1.

Acciones farmacológicas. Se ha demostrado que algunas vitaminas a altas dosis pueden ejercer efectos beneficiosos sobre determinadas condiciones patológicas. Estos efectos no tienen relación con la función específica de la vitamina como nutriente, sino como fármaco.

VITAMINAS LIPOSOLUBLES

VITAMINA A

Sinonimia. Retinol, axeroftol, vitamina antixeroftálmica.

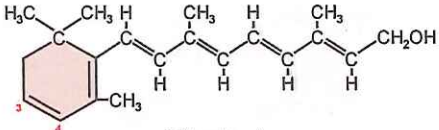
Química. La vitamina A o *retinol* es insoluble en agua, soluble en grasas y solventes orgánicos. Cristaliza en prismas amarillos. Su fórmula molecular es $C_{20}H_{30}O$, posee un ciclo de seis carbonos (β-ionona) con una cadena lateral constituida por dos unidades isopreno y una función alcohol primario en la posición 6. Los isómeros *trans* en todos los dobles enlaces (todo-*trans*) de la cadena (fig. 27-1) poseen máxima actividad.

El retinol se descompone si se lo somete a calentamiento prolongado en contacto con el aire.

Existen dos vitámeros (A_1 y A_2) (fig. 27-1). A_1 predomina en tejidos de mamíferos, posee un doble enlace adicional entre carbonos 3 y 4 del anillo β-ionona. A_2 es más abundante en peces.

Retinaldehído o *retinal* y *ácido retinoico* son derivados obtenidos por oxidación del retinol;

Vitamina A_1



Vitamina A_2

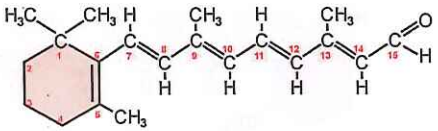
Fig. 27-1. Retinol todo-*trans*.

ambos poseen actividad biológica. Un isómero del retinal, el 11-*cis*-retinal (fig. 27-2), está presente en la retina.

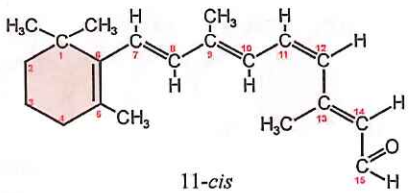
El ácido retinoico se obtiene por oxidación del retinal; se encuentran isómeros todo-*trans* y 9-*cis* (fig. 27-3).

La designación vitamina A incluye a los compuestos con actividad similar a la del todo-*trans*-retinol; el término *retinoides* comprende a las formas naturales de vitamina A y a los análogos obtenidos por síntesis.

En los vegetales existen pigmentos llamados *carotenos*, que son sustancias precursoras o provitaminas A; en el organismo se desdoblan y dan origen a la vitamina A. Los compuestos de este grupo se llaman *carotenoides*. Poseen una cadena formada por unidades isopreno con un anillo β-ionona en uno o en los dos extremos. Los más co-

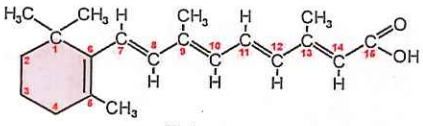


Todo-*trans*

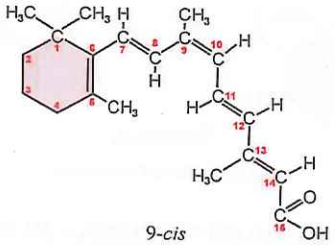


11-*cis*

Fig. 27-2 Retinal.



Todo-*trans*



9-*cis*

Fig. 27-3. Ácido retinoico.

munes son β-caroteno, α-caroteno y β-criptoxantina (fig. 27-4). Los isómeros todo-*trans* son los más abundantes y estables.

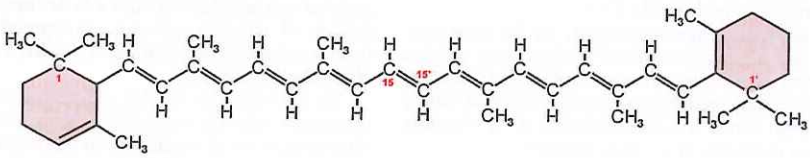
El β-caroteno, molécula simétrica de 40 carbonos, es el más ampliamente distribuido en la naturaleza. Es el de mayor actividad provitamínica porque genera, por oxidación, dos moléculas de retinal. Los otros carotenos precursores de vitamina A engendran sólo un retinal.

Los carotenoides no son afectados por la cocción.

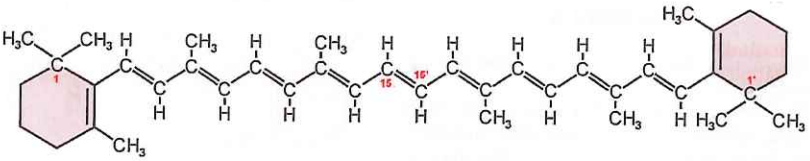
Fuentes naturales. La vitamina A se encuentra en alimentos de origen animal. Hígado, leche, queso, manteca, huevos y pescados (atún, sardinas) son buenas fuentes; el riñón y la carne contienen menor cantidad. El hígado de algunos peces (tiburón, bacalao) es notablemente rico en vitamina A.

Los carotenoides se encuentran en vegetales pigmentados (zanahoria, zapallo, batata, tomate, maíz amarillo, brócoli, arvejas, espinaca, acelga, y frutas). El β-caroteno es el más abundante en la dieta habitual.

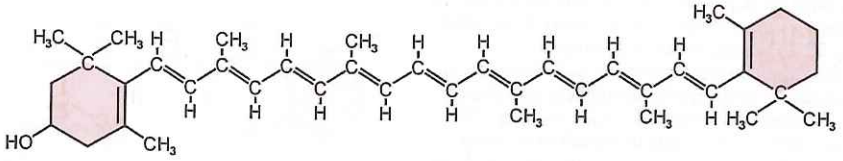
Absorción intestinal. La absorción de retinol, así como la de sus precursores, está asociada a la de lípidos. Al igual que las grasas de la dieta, los ésteres de retinol y los carotenos deben ser emulsionados por acción de sales biliares y productos



α - caroteno (todo *trans*)



β - caroteno (todo *trans*)



β - criptoxantina (todo *trans*)

Fig. 27-4. Carotenos.

de la digestión de lípidos para ser absorbidos. Cualquier condición que entorpezca la emulsificación (falta de ácidos biliares o de grasas en los alimentos), reduce la absorción intestinal de retinol.

Los ésteres de retinol son hidrolizados por lipasas y esterasas del jugo pancreático y borde en cepillo. Gracias a su escasa polaridad, el retinol atraviesa con facilidad la membrana apical, pero su ingreso se hace principalmente por difusión facilitada. Se absorbe entre 70 y 90% del retinol y de 10 a 20% del β-caroteno presentes en los alimentos. En el borde en cepillo, una *monooxigenasa* cataliza la ruptura del doble enlace entre carbonos 15 y 15' del β-caroteno y genera dos moléculas de retinal. El retinal es convertido en retinol por *retinal reductasa* o *retinol deshidrogenasa* y esterificado con un acilo de cadena larga. En cuanto a los carotenoides, buena parte no alcanza a ser escindida en los enterocitos y pasa intacta a la circulación incluida, al igual que la vitamina A, en los quilomicrones.

Metabolismo y almacenamiento. En la circulación, los quilomicrones se convierten en remanentes, que son captados por el hígado. El retinol se almacena en el hígado, que tiene un rol central en el mantenimiento de la homeostasis de la vitamina A. Cuando la ingesta es pobre, el hígado moviliza sus reservas.

La *retinol deshidrogenasa* dependiente de NAD^+ o $NADP^+$ convierte reversiblemente retinol en retinal. A partir del retinal se produce ácido retinoico en reacción irreversible, catalizada por *retinal deshidrogenasa*. No existen enzimas que reduzcan ácido retinoico a retinal.

Los carotenoides que no alcanzan a ser transformados en retinal son incorporados en las VLDL y enviados a otros tejidos, particularmente el adiposo, lo que otorga a éste un tinte amarillento.

Transporte en sangre. Los ésteres de retinol en el hígado son hidrolizados, el retinol todo-*trans* es enviado a la circulación unido a la *proteína fijadora de retinol* (RBP), sintetizada en hígado. En la sangre, el complejo retinol-RBP se une a *transtirretina* (TTR) y forma una agrupación macromolecular que evita la pérdida de la vitamina por orina. Al llegar a las membranas de las células "blanco" o "diana" los retinoides se desprenden de la proteína transportadora e ingresan en el citoplasma.

No existen en el plasma proteínas específicas para el transporte de carotenoides; los que pasan desde el hígado a la sangre lo hacen incorporados en las VLDL.

Papel funcional. La principal forma activa es el ácido retinoico, comprometido en el crecimiento y desarrollo, la reproducción y la inmunidad. El retinol participa en la reproducción y el retinal es esencial para la visión.

Mecanismo de acción. La mayor parte de las acciones de los retinoides, como las de muchas hormonas, son genómicas, mediadas por receptores existentes en el núcleo de las células, capaces de unirse a sitios específicos del ADN y de regular la actividad de genes que codifican enzimas, factores de transcripción y otras proteínas, incluyendo algunas relacionadas con la muerte celular programada o apoptosis. Se estima que los retinoides modulan la expresión de varios centenares de genes.

El ácido retinoico todo-*trans* dentro de las células se une a la proteína fijadora CRABP (*cellular retinoic acid binding protein*) que lo transporta hasta el núcleo donde se fija a receptores, designados con las siglas RAR y RXR, ambos pertenecientes a la superfamilia de receptores de esteroides y hormonas tiroideas. La unión del retinoide provoca un cambio conformacional que induce la formación de heterodímeros RAR-RXR. Estos se fijan a secuencias específicas del ADN en el promotor llamadas *elementos de respuesta al receptor de ácido retinoico* e influyen sobre la actividad de transcripción.

Diferenciación y proliferación celular. Los retinoides modulan la actividad de genes que codifican proteínas relacionadas con la proliferación celular. A estas acciones se debe su influencia sobre los epitelios (de piel y tractos gastrointestinal, respiratorio y urogenital). El ácido retinoico ayuda a mantener la estructura y funciones de las células epiteliales; promueve la diferenciación de los queratinocitos en la epidermis y de las células secretoras de mucus en otros epitelios. Además, la vitamina A participaría en la síntesis de enzimas comprometidas en la producción de glicoproteínas de superficies celulares.

En experimentos *in vitro* y en animales de laboratorio, los retinoides han demostrado capacidad para deprimir el crecimiento de tumores o proteger a las células del efecto de agentes cancerígenos.

Desarrollo y crecimiento. Durante el desarrollo del embrión, la expresión génica es rigurosamente regulada y coordinada en el tiempo. El ácido retinoico está involucrado en la inducción de la morfogénesis a través del control de genes de la familia homeobox (*Hox*), que guían el desarrollo corporal. En etapas más tardías de la gestación, el retinol se suma en estas acciones.

Reproducción. El ácido retinoico es requerido para un normal funcionamiento del aparato genital femenino desde la implantación del embrión. Junto con el retinol estimulan la producción de progesterona. En el macho, el ácido retinoico y

el retinol participan en el proceso de espermatogénesis.

Inmunidad. En el sistema inmunitario, la vitamina A, particularmente el ácido retinoico, estimula el desarrollo de linfocitos B y T auxiliares, la actividad fagocitaria y la producción de citoquinas. Por otro lado, la función de defensa propia de piel y mucosas depende en buena medida del aporte de vitamina A.

Visión. La participación de la vitamina A en la visión es dual, el retinal participa, mediante acciones no genómicas, en el proceso de captación de los estímulos luminosos y el ácido retinoico, por mecanismos genómicos, es indispensable para mantener la integridad y transparencia del epitelio corneal.

En la retina, los bastoncillos son los responsables de la visión nocturna o en ambientes escasamente iluminados. En ellos juega un papel fundamental la *púrpura visual* o *rodopsina*, proteína conjugada de la familia de receptores acoplados a proteínas G. Está formada por la apoproteína *opsina* y el grupo prostético *11-cis-retinal*. En el epitelio pigmentario de la retina el retinol todo-*trans* es convertido en 11-*cis*-retinol por una *isomerasa*, y oxidado a 11-*cis*-retinal por *11-cis-retinol deshidrogenasa*. El transporte del 11-*cis*-retinal dentro de las células es realizado por la *proteína celular fijadora de retinal* (CRALBP), que lo conduce hasta el intersticio que separa al epitelio del fotorreceptor, y lo cede a la *proteína intersticial fijadora de retinol* (IRBP). Al llegar a los bastoncillos, el 11-*cis*-retinal se libera y se une a la opsina para formar rodopsina.

Cuando la luz incide en la retina, el retinal pasa de *11-cis* a todo-*trans*. Esta conversión es indispensable para la captación del estímulo luminoso. La isomerización *cis-trans* del retinal determina su separación de la opsina y cambios conformacionales que se transmiten a una proteína G llamada *transducina*; ésta provoca disminución del nivel de GMP cíclico, cierre de canales de Na^+ e hiperpolarización y genera el impulso nervioso responsable de la percepción de la luz.

Para que el bastoncillo vuelva a funcionar debe regenerarse la rodopsina. El todo-*trans*-retinal es reducido a todo-*trans*-retinol y transportado desde el fotorreceptor al epitelio pigmentario por la IRBP. La rodopsina se reconstituye gracias a un ciclo metabólico, esquematizado en la figura 27-5.

El tiempo requerido para recomponer la púrpura visual explica el momentáneo enceguecimiento o "encandilamiento" posterior a la incidencia de un haz luminoso potente en la retina y el período de adaptación necesario para ver nuevamente cuando se pasa de un ambiente intensamente iluminado a otro en penumbra. En personas normales el ciclo de regeneración de la rodopsina se cumple en un tiempo muy corto porque las células del epitelio pigmentario mantienen una reserva de ésteres de retinilo. En las deficiencias de vitamina A falta precursor del *cis* retinal y el ciclo se hace más lento. Puede llegarse a la total falta de visión en ambientes con poca luz ("*ceguera nocturna*" o *nictalopía*).

Requerimientos. (Tabla 27-1). Se expresaba la actividad vitamínica A en términos de

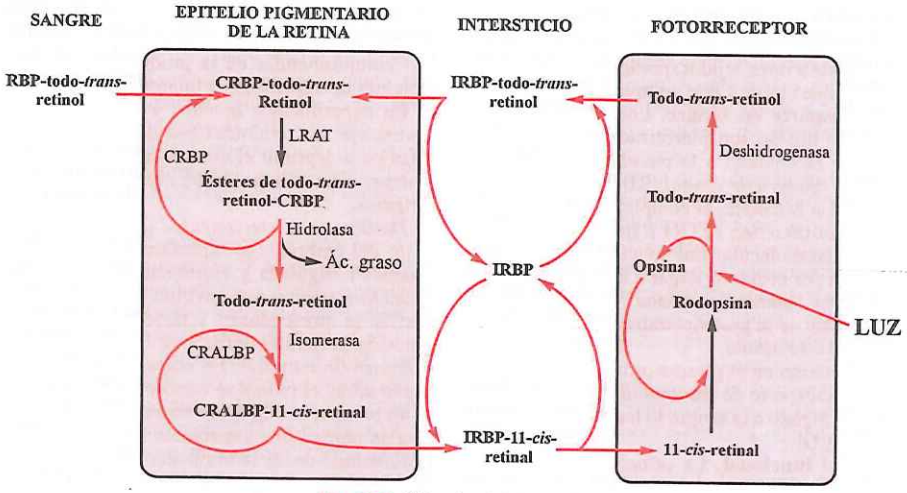


Fig. 27-5. Ciclo visual del retinol.

Unidades Internacionales (UI); una UI era igual a 0,3 μg de retinol. En la actualidad se prefiere la expresión *Equivalentes de Actividad de Retinol* (EAR) iguales a 1 μg de retinol, a 12 μg (o 14 μg para algunos autores) de β-caroteno y a 24 μg (o 28 μg) de otros carotenoides precursores de vitamina A. Estas equivalencias tienen en cuenta la absorción menos eficiente de los carotenoides.

Efectos tóxicos. El retinol es depositado en hígado y se elimina muy lentamente; por eso existe riesgo de acumulación excesiva si se lo administra en dosis elevadas. Tratamientos prolongados con cantidades superiores a las necesidades normales pueden producir intoxicación crónica. Hay pérdida de apetito, fatiga, alteraciones de la piel (eritema, prurito, descamación) y mucosa bucal, dolores óseos y articulares, hepatomegalia, edema, alteraciones neuromusculares y psíquicas. Una dosis única exagerada (por ej., 300.000 EAR) puede causar intoxicación aguda, con dolor abdominal, cefaleas, vómitos, aumento de la presión intracraneana. La ingesta de más de 7.500 μg de retinol en mujeres durante las primeras etapas del embarazo (preconcepción y primer trimestre) provoca anomalías de desarrollo en el feto (acción teratogénica). Durante la gestación se advierte no consumir dosis mayores que las recomendadas.

Los carotenoides no producen cuadros tóxicos, en primer lugar porque el ingreso por intestino es limitado.

Avitaminosis. La deficiencia de vitamina A afecta a muchas personas, especialmente de los sectores más pobres. Se estima que más del 30% de la población mundial está en riesgo de hipovitaminosis; son particularmente afectados los niños menores de 6 años.

Los síntomas iniciales de la deficiencia están relacionados con el papel de la vitamina en la función visual. Hay fotofobia, es decir, molestia manifiesta ante la incidencia de la luz. El trastorno más común es el aumento del tiempo necesario hasta volver a percibir imágenes después de una reducción brusca de la intensidad lumínica, o la incapacidad para ver en ambientes poco iluminados (*ceguera nocturna* o *nictalopía*), relacionada con la falla en la regeneración rápida de 11-*cis*-retinal.

El crecimiento y diferenciación de todas las células epiteliales están afectados; en la epidermis las células de cubierta no se regeneran, se aplanan y acumulan queratina. La piel se muestra reseca, con hiperqueratosis e intensa descamación. Las glándulas lagrimales reducen su secreción; la conjuntiva se seca y pronto se observan erosiones y úlceras, incluso en la superficie de la córnea. Fácilmente se instalan infecciones, los párpados se muestran tumefactos, con bordes descamados y secreción purulenta. La cicatrización de las úlceras corneales determina opacificación. Este cuadro, denominado *xeroftalmía*, provoca daños permanentes y pérdida de la visión si no se trata a tiempo.

El compromiso de los epitelios en los tractos respiratorio, digestivo y genitourinario puede ser intenso. La queratinización reduce su capacidad para servir de barrera al ingreso de gérmenes, por lo cual los individuos carenciados, especialmente niños, son presa fácil de infecciones. Además de la alteración de los epitelios son también evidentes, como consecuencia de la hipovitaminosis A, efectos sistémicos que comprometen los mecanismos innatos y adaptativos (inmunidad humoral y celular) de resistencia a las infecciones. Todos estos factores determinan mayor riesgo de morbi-mortalidad por causas infecciosas.

Hay alteraciones en cartílagos epifisarios, con retardo en el crecimiento óseo y defectos en la estructura del hueso en formación. Los defectos en el esmalte favorecen la producción de anomalías dentarias.

La administración de vitamina A a sectores de la población en riesgo de padecer hipovitaminosis ha demostrado ser eficaz en reducir la mortalidad y los problemas relacionados con la falta de retinoides en diversas regiones del mundo. El agregado de la vitamina a la leche de consumo es una medida eficaz.

Acciones farmacológicas. Numerosos estudios epidemiológicos indican que la hipovitaminosis A frecuentemente se acompaña de mayor riesgo de desarrollar tumores malignos. Se han investigado los efectos de la administración de vitamina A en varios tipos de neoplasias. Los mejores resultados han sido observados en la leucemia promielocítica aguda, con remisiones completas en gran proporción de casos.

El ácido retinoico todo-*trans* y derivados sintéticos se emplean en el tratamiento de acné y psoriasis.

La administración de los retinoides debe ser cuidadosamente supervisada especialmente en mujeres en edad fértil. Dosis elevadas de la vitamina o derivados tienen efectos teratogénicos.

VITAMINA D

Sinonimia. Calciferol, vitamina antirraquítica.

Química. Se obtiene como cristales blancos; es soluble en grasas y solventes orgánicos, resis-

tente al calor y a la oxidación. Existen dos vitámeros, la vitamina D_2 o *ergocalciferol*, presente en vegetales, y la vitamina D_3 o *colecalciferol*, en tejidos animales. Derivan del ciclopentanoperhidrofenantreno. Los vitámeros difieren en la cadena lateral (fig. 27-6). En la natutaleza existen precursores: el *ergosterol* (provitamina D_2) y el *7-deshidrocolesterol* (provitamina D_3). La luz ultravioleta produce en ellos apertura del anillo B del ciclopentanoperhidrofenantreno y los convierte en vitámeros de vitamina D (fig. 27-6).

Fuentes naturales. El contenido de vitamina D en los alimentos comunes es pobre. Yema de huevo, leche entera, manteca, hígado, carne de ternera o novillo y aceites vegetales contienen pequeña cantidad. Algunos pescados (salmón, atún, sardina, arenque) tienen algo más. Las hortalizas y frutas no tienen vitamina D. De los precursores de vitamina D, el ergosterol se encuentra en vegetales, hongos y levaduras. El 7-deshidrocolesterol está ampliamente distribuido en el reino animal; es sintetizado en las glándulas sebáceas y secretado hacia la superficie de la piel, desde donde penetra en la epidermis. Cuando la piel es expuesta al sol, la radiación ultravioleta B (longitud de onda entre 290 y 315 nm; máxima acción a 297 nm) convierte el 7-deshidrocolesterol en vitamina D_3 o colecalciferol (fig. 27-6).

Absorción intestinal. Algunos alimentos de origen animal contienen pequeña cantidad de vitamina D esterificada con ácidos grasos. Los ésteres son hidrolizados en la luz intestinal y la vitamina se absorbe en los dos tercios superiores del intestino delgado; se requiere la presencia de sales biliares y de los factores que aseguran una adecuada digestión y absorción de grasas. La vitamina D, junto con otros lípidos, ingresa por difusión simple. En los enterocitos es incorporada en los quilomicrones y enviada al sistema linfático.

Transporte. Los quilomicrones pasan a la circulación, en la cual buena parte del colecalciferol es transferida a la *proteína fijadora de vitamina D* (DBP, *D binding protein*). La vitamina D_3 formada en la piel pasa a la sangre, se une a DBP y sigue el mismo camino que la absorbida en intestino. Tanto la vitamina que queda en los remanentes de quilomicrones, como la unida a DBP, son captadas por el hígado.

Metabolismo. La producción y disponibilidad de vitamina D dependen de la exposición a la luz ultravioleta o de su provisión con la ingesta. En

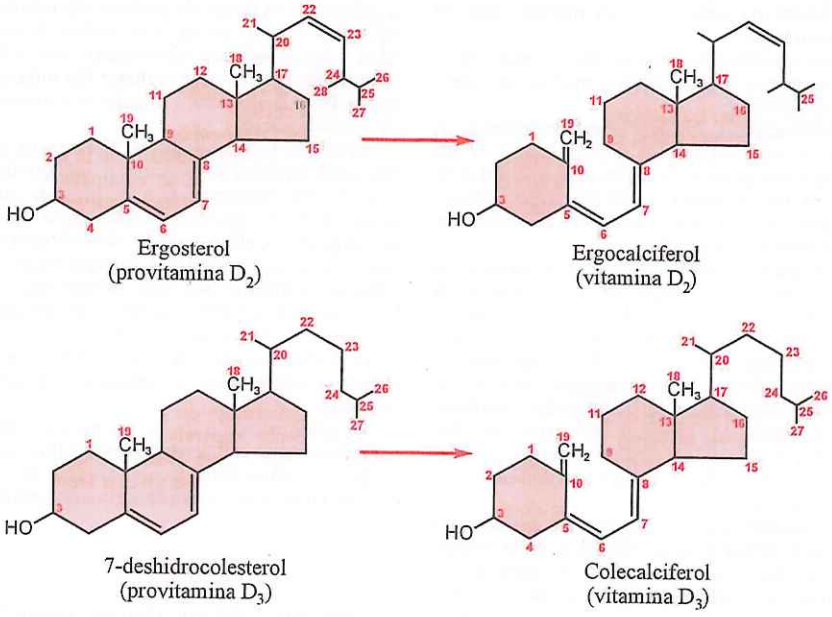


Fig. 27-6. Estructura de precursores y vitámeros de vitamina D.

realidad es una prohormona sin actividad biológica; para adquirir sus propiedades funcionales debe sufrir modificaciones químicas que la convierten en productos activos. El ergocalciferol experimenta los mismos cambios que el colecalciferol.

Formación de 25-OH-D_3. La primera etapa en la activación de la vitamina se cumple en el hígado. Por acción de la *colecalciferol-25-hidroxilasa* se genera *25-hidroxicolecalciferol* o *calcidiol* (25-OH-D_3) (fig. 27-7). La cantidad de 25-OH-D_3 formado es proporcional a la provisión de vitamina D_3.

Formación de 1,25-$(OH)_2$-D_3. La próxima etapa en la activación de la vitamina D ocurre en riñón; después que el complejo calcidiol-DBP ha filtrado en glomérulos, el 25-OH-D_3 ingresa a través del borde en cepillo de los túbulos proximales. El 25-OH-D_3 es liberado y transportado hacia las mitocondrias, donde la *25-OH-D_3-1α-hidroxilasa*, enzima inducible y regulable, forma *dihidroxicolecalciferol* o *calcitriol* (1,25-$(OH)_2$-D_3).

En la sangre, calcidiol y calcitriol son transportados por la *proteína fijadora de vitamina D* (DBP).

Formación de 24,25-$(OH)_2$-D_3. La *25-OH-D_3-24-hidroxilasa* de mitocondrias de riñón agrega un OH en el carbono 24 del calcidiol y genera *24,25-dihidroxi-colecalciferol* (24,25-$(OH)_2$-D_3).

La 1 y la 24 hidroxilasas son regulables; factores que activan la producción de 1,25-$(OH)_2$-D_3 deprimen la de 24,25-$(OH)_2$-D_3 y viceversa. El aumento de los niveles de calcitriol induce síntesis de 24-hidroxilasa.

Papel funcional. Los metabolitos activos de vitamina D son reguladores de la homeostasis de calcio y fosfato. Producen aumento de los niveles extracelulares de calcio y fósforo. Sus principales órganos efectores son la mucosa intestinal, el hueso y los riñones. Además ejercen otras acciones, no relacionadas con el calcio, que involucran a otros tejidos.

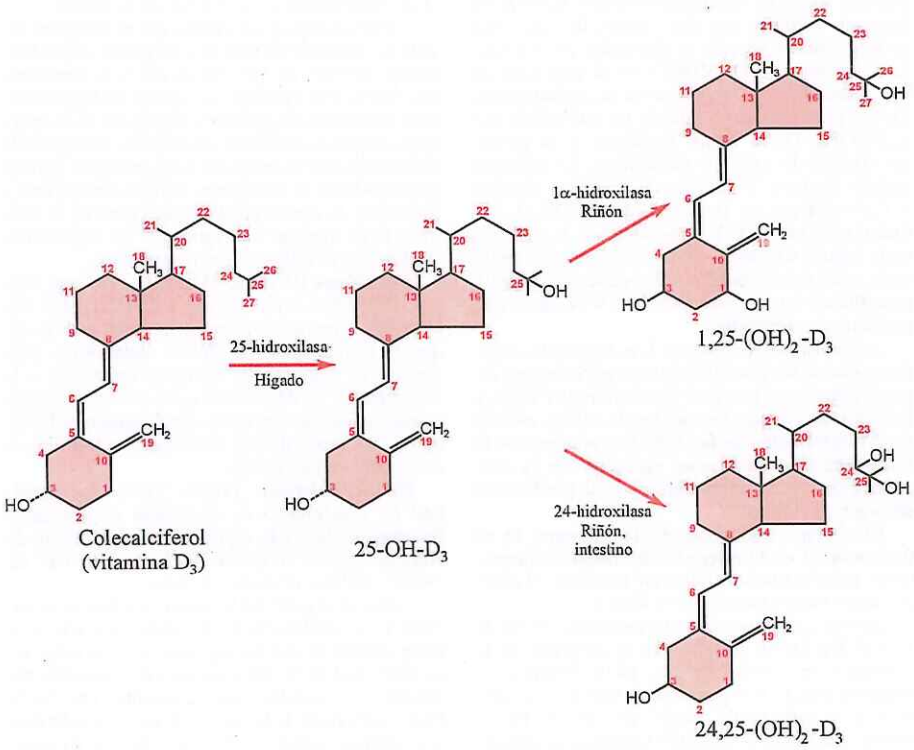


Fig. 27-7. Formación de metabolitos activos de vitamina D_3.

Mecanismo de acción. El 1,25-$(OH)_2$-D_3 es el derivado de mayor actividad biológica; mucho menor es la de 24,25-$(OH)_2$-D_3 y 25-OH-D_3. Ejercen acciones genómicas y no genómicas.

Acciones genómicas. El calcitriol actúa a nivel del ADN nuclear de las células efectoras de manera similar a la de hormonas esteroides, tiroideas y retinoides. Los calciferoles atraviesan la membrana plasmática sin dificultad; en el citosol y en el núcleo existen receptores específicos (VDR_n) pertenecientes a la superfamilia de receptores de esteroides. El VDR_n tiene mayor afinidad para 1,25-$(OH)_2$-D_3 que para los otros metabolitos. Los VDR se encuentran en los órganos reconocidos como "blanco" de la hormona y, en menor cantidad, en otros no considerados anteriormente como tales. VDR_n actúa como factor de transcripción activado por ligando. La unión de 1,25-$(OH)_2$-D_3 produce un cambio conformacional que habilita al conjunto D-VDR para ser transportado hacia el núcleo y formar heterodímeros con receptores de retinoides (RXR). La porción VDR del complejo calcitriol-VDR-RXR tiene un dominio con dos "dedos de zinc" que se fija específicamente a *elementos de respuesta a la vitamina D* (VDRE) en el promotor de los genes "blanco" y promueve la transcripción. De las proteínas cuya síntesis es estimulada por 1,25-$(OH)_2$-D_3, la mejor estudiada es la proteína fijadora de calcio o *calbindina*. El calcitriol induce también la síntesis de fosfatasa alcalina y Ca^{2+}-ATPasa en intestino, de 25-OH-D_3-24-hidroxilasa en riñón y otros órganos, y participa en la regulación de la síntesis de varias proteínas de la matriz ósea (colágeno I, osteocalcina, sialoproteína de hueso, osteopontina) y de otras aún no bien caracterizadas.

Acciones no genómicas. Las respuestas rápidas promovidas por calcitriol se ejercerían por interacción con un receptor de membrana (VDR_m). Incluyen activación de canales de calcio, efectos en el metabolismo de fosfolípidos, aumento de la fluidez de las membranas, elevación de la concentración de Ca^{2+} intracelular y de la producción de prostaglandinas.

El sistema endocrino de la vitamina D es fundamental en la interrelación intestino-hueso-riñón-glándula paratiroides que mantiene el nivel de calcio dentro de estrechos límites.

Acción sobre intestino. El principal efecto de 1,25-$(OH)_2$-D_3 en intestino es el aumento de la absorción de calcio (ver pág. 641). Produce: a) aumento rápido (no genómico), que estaría asociado a la apertura de canales de Ca^{2+}; b) incremento más tardío y sostenido (genómico), debido a inducción de la síntesis de calbindina y de Ca^{2+}-ATPasa. También aumenta la absorción de fosfato en la porción distal de yeyuno e íleon.

Acción sobre hueso. La vitamina D favorece la biomineralización y remodelación del hueso: a) eleva la concentración local de calcio y fosfato; b) activa la resorción.

La síntesis de *colágeno tipo I* y *sialoproteína de hueso* es regulada por varios factores, entre ellos 1,25-$(OH)_2$-D_3. La expresión de *osteopontina* y de *osteocalcina* es estimulada por calcitriol. Se forma nueva matriz osteoide, cuya mineralización es favorecida por el incremento de calcio y fosfato.

Acción sobre riñón. El 1,25-$(OH)_2$-D_3 activa la reabsorción de calcio y fosfato. El calcitriol se autorregula por represión de la síntesis de 25-OH-D_3-1α-hidroxilasa, e inducción de la de 25-OH-D_3-24-hidroxilasa.

Acción sobre paratiroides. El sistema endocrino calcitriol-VDR es un poderoso regulador de la función de la glándula paratiroides. Reprime la síntesis y secreción de PTH y modula la respuesta de paratiroides a los niveles de calcemia.

Otras acciones. Se estima que el calcitriol regula la expresión de más de cien genes, cuyas funciones exceden las vinculadas con la homeostasis del calcio. Por ejemplo, es agente de diferenciación y maduración celular y regulador de la apoptosis, inhibe la proliferación celular, promueve la diferenciación de monocitos-macrófagos, células presentadoras de antígenos, células dendríticas y linfocitos, lo que explica la capacidad de la vitamina D de mejorar la respuesta a las infecciones y aumentar la tolerancia a transplantes.

Funciones de 24,25-$(OH)_2$-D_3. No han sido tan estudiadas como las del 1,25-$(OH)_2$-D_3. Sin embargo, algunas evidencias indican que se requiere la presencia de ambos metabolitos para generar el conjunto de acciones atribuidas a la vitamina D. El 24,25-$(OH)_2$-D_3 es esencial para la reparación de fracturas óseas actuando localmente por mecanismos paracrinos, autocrinos, o sistémicos (endocrinos).

Requerimientos. (Tabla 27-1). La cantidad de vitamina D se expresaba en Unidades Internacionales (UI), equivalentes a 0,025 μg de colecalciferol o vitamina D_3 (1 μg = 40 UI). Se prefiere utilizar unidades de peso.

Como el organismo humano sintetiza la provitamina 7-deshidrocolesterol y éste genera la vitamina cuando la piel es expuesta a la luz solar, no es fácil establecer con exactitud el requerimiento dietario. Se considera que 15 minutos por día de exposición al sol de las zonas de piel normalmente descubiertas (rostro, cuello y manos) son suficientes para producir el colecalciferol necesario. No

obstante, a fin de garantizar una provisión adecuada, se aconseja la ingesta de vitamina D.

Efectos tóxicos. La vitamina D produce hipervitaminosis cuando se administran cantidades exageradas. Hay inapetencia, náuseas, aumento de la diuresis, sed, hipercalcemia, hiperfosfatemia, hipercalciuria e hiperfosfaturia. Suelen aparecer calcificaciones en tejidos blandos (riñón, pulmón).

Los excesos de exposición a los rayos solares no producen hipervitaminosis gracias a la lentitud de la conversión de 7-deshidrocolesterol en colecalciferol y a la formación de isómeros inactivos.

Avitaminosis. La deficiencia de vitamina D en los primeros años de vida es la causa de una enfermedad conocida desde tiempos remotos, el *raquitismo*. En adultos, produce *osteomalacia*.

Insuficiente exposición de la piel a la luz solar resulta en hipovitaminosis. Aun cuando la alimentación no sea adecuada, no se observa raquitismo grave en niños que tienen amplia oportunidad de recibir irradiación solar. En regiones alejadas del ecuador (latitudes superiores a los 45°), hay pocas horas de sol en invierno; en las ciudades el problema se agrava por las características de la edificación y la contaminación del aire.

La avitaminosis produce fallas en la calcificación ósea; en niños pequeños, hay retraso en el cierre de las fontanelas, engrosamiento de las articulaciones condrocostales y epífisis; el cartílago continúa creciendo, pero no es reemplazado por la matriz orgánica (osteoide) ni se deposita el componente mineral (hidroxiapatita). Cuando el niño empieza a caminar, los fémures y tibias deficientemente calcificados ceden al peso del cuerpo, lo que da lugar a malformaciones; la más frecuente es el *genus valgum*, en el cual ambas piernas se arquean con la convexidad hacia afuera. Radiográficamente los huesos son menos densos que los normales. Se producen anomalías de forma y pobre desarrollo de los dientes.

La deficiencia de vitamina D y de calcio en el adulto resulta en desmineralización del hueso, trastorno llamado *osteomalacia*. Los principales síntomas son debilidad muscular y dolores óseos, especialmente a nivel de las caderas. Raramente se observan deformaciones en el esqueleto. En personas mayores de 75 años, hay mayor riesgo de deficiencia y, por ende, de osteomalacia. A la disminución de la síntesis de la provitamina 7-deshidrocolesterol en la piel se agrega la menor exposición a la luz solar. La reducida mineralización ósea favorece la producción de fracturas.

Estudios epidemiológicos comprobaron la existencia de asociación entre cáncer de próstata, de mama y de colon y deficiencia de vitamina D. La hipovitaminosis aumenta el riesgo de transformación celular maligna.

Insuficiencia renal e hipoparatiroidismo afectan la 1α-hidroxilación de 25-OH-D_3 y pueden asociarse a raquitismo u osteomalacia. Fallas genéticas producen cuadros de raquitismo (raquitismo hipofosfatémico familiar y raquitismos resistentes a vitamina D).

Aplicaciones farmacológicas. En la insuficiencia renal crónica e hipoparatiroidismo se obtienen mejorías con la administración de dosis muy altas de vitamina D (250 a 500 μg por día). Esta acción terapéutica se explica por el gran aumento de 25-(OH)-D_3 plasmático subsiguiente a altas dosis de calciferol, ya que niveles elevados de este metabolito mimetizan la acción del calcitriol.

Se están utilizando 1,25-$(OH)_2$-D_3 y análogos sintéticos en el tratamiento de osteodistrofia renal y osteoporosis, psoriasis e hiperparatiroidismo secundario y se investiga su posible utilidad como agentes inmunosupresivos y antineoplásicos en cánceres de mama, colon, próstata y leucemias.

VITAMINA E

Sinonimia. Vitamina antiesterilidad en ratas.

Química. La vitamina E es soluble en grasas, alcohol y otros solventes orgánicos e insoluble en agua; es relativamente estable. Existen dos grupos de compuestos con actividad de vitamina E (vitámeros), *tocoferoles* y *tocotrienoles*, todos derivados metilados de una estructura básica llamada *tocol*. El tocol posee un núcleo cromano con un hidroxilo en posición 6 (6-hidroxicromano o 6-cromanol) y, en la posición 2, un metilo y una cadena lateral fitilo de 15 carbonos constituida por la unión de tres unidades de isopreno (fig. 27-8).

Tocoferoles y *tocotrienoles* difieren entre sí en número y posición de metilos, grado de saturación de la cadena y actividad biológica. Los llamados α poseen tres metilos en las posiciones 5, 7, y 8 del cromanol; β, dos metilos en 5 y 8; γ, dos metilos en 7 y 8 y δ, sólo uno en posición 8 (fig. 27-8).

La cadena isoprenoide de los tocoferoles es saturada, la de los tocotrienoles tiene dobles ligaduras entre los carbonos 3'–4', 7'–8' y 11'–12' (fig. 27-9).

La capacidad antioxidante de vitamina D se debe a la facilidad con la cual el -OH en posición 6 cede su H.

Fuentes naturales. Los granos de cereales y semillas ricos en lípidos son excelentes fuentes.

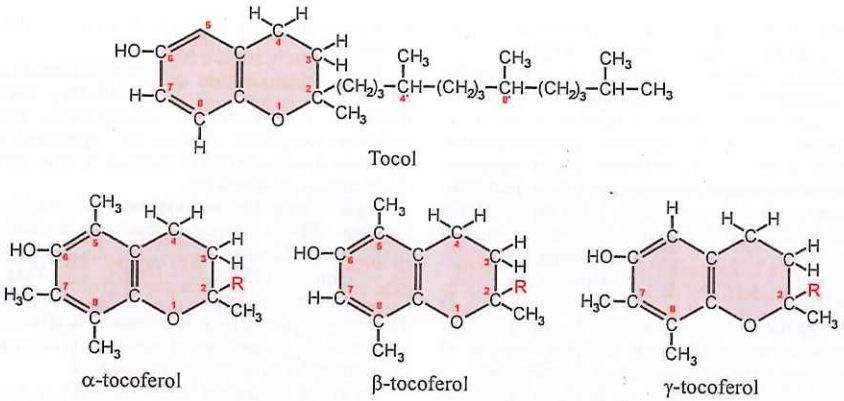


Fig. 27-8 Tocoferoles.

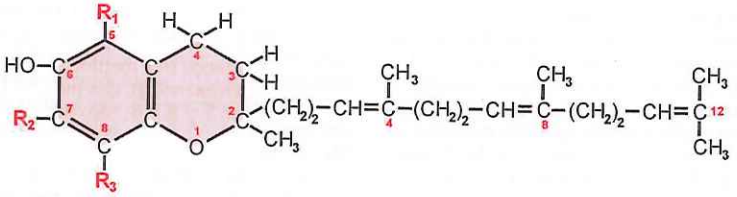
Los aceites de soja, maíz, girasol y maní contienen buena cantidad, así como el germen de trigo, almendras, nueces y avellanas; hay muy poco en carnes, huevos y productos lácteos. Los alimentos difieren no sólo en su contenido de vitamina E, sino también en la cantidad relativa de los vitámeros.

Absorción intestinal. Los tocoferoles α y γ son los más comunes en la dieta; se encuentran libres o esterificados con ácidos grasos, que son hidrolizados por enzimas pancreáticas y de la mucosa de intestino delgado. La absorción, como la de otras vitaminas liposolubles, requiere presencia de los factores que aseguran digestión normal de grasas y se realiza por difusión pasiva. La proporción absorbida disminuye al aumentar la cantidad ingerida. En los enterocitos, la vitamina es incorporada en los quilomicrones.

Transporte. En la sangre, los quilomicrones se convierten en remanentes. Parte de la vitamina es transferida a lipoproteínas de alta densidad (HDL) y éstas intercambian con VLDL y LDL. La que queda en los remanentes es captada por el hígado e incorporada a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) que se liberan a la circulación.

Metabolismo. Después de la conversión de VLDL en LDL, los tocoferoles ingresan en las células de tejidos periféricos por los receptores de LDL. El exceso de vitamina se almacena en varios tejidos, principalmente adiposo.

Papel funcional. La propiedad más notable de la vitamina E es su capacidad antioxidante. Su papel mejor conocido es la protección de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) del daño oxidativo al que están expuestos (ver capítulo 10). La vitamina E reacciona con radicales peroxilo y



Alfa-Tocotrienol: $R_1 = CH_3$; $R_2 = CH_3$; $R_3 = CH_3$

Beta-Tocotrienol: $R_1 = CH_3$; $R_2 = H$; $R_3 = CH_3$

Gamma-Tocotrienol: $R_1 = H$; $R_2 = CH_3$; $R_3 = CH_3$

Fig. 27-9. Tocotrienoles.

forma hidroperóxidos y un radical de vitamina E relativamente estable. La vitamina E también previene de la oxidación a otros compuestos de membranas y a las LDL.

Después de su reacción con radicales libres, la vitamina E debe ser regenerada a su estado inicial y en ello intervienen antioxidantes como la vitamina C (ácido ascórbico).

Otras funciones. El α-tocoferol, gracias a su cadena isoprenoide saturada, interactúa con las cadenas de ácidos grasos poliinsaturados en la doble capa lipídica y contribuye a estabilizar la estructura de la membrana.

Requerimientos. (Tabla 27-1). Actualmente se prefiere utilizar la expresión *Equivalentes de α-tocoferol* (EαT), iguales a 1 mg del compuesto. A mayor consumo de ácidos grasos poliinsaturados, mayor es el requerimiento de la vitamina. Se aconseja mantener la relación de 0,5 EαT por cada gramo de AGPI.

La dieta habitual provee la cantidad requerida; en personas sanas no son necesarios aportes adicionales.

No se han observado efectos tóxicos significativos de vitamina E en humanos.

Avitaminosis. Las manifestaciones de la deficiencia de vitamina E varían notablemente según la especie estudiada. En ratas, ratones y cerdos produce serios daños en el sistema reproductor, con alteración del epitelio germinal y esterilidad. En la hembra, si se alcanza la fecundación, los embriones mueren y son reabsorbidos. En el macho, el epitelio seminífero se atrofia y sobreviene esterilidad permanente. Estas observaciones indujeron a asociar la vitamina E con capacidad reproductora; se la designó "factor antiesterilidad" y se la propuso para tratar la infertilidad en humanos. Los resultados fueron negativos; la esterilidad en humanos no es expresión de carencia de tocoferol.

En la mayoría de animales es común la alteración funcional y estructural de músculos cardíaco, esquelético y liso. En cerdos y ratas se observa necrosis hepática. En pollos, hay síntomas de degeneración del sistema nervioso. Es frecuente el acortamiento del tiempo de vida de los eritrocitos, con anemia de tipo hemolítico. La mayor parte de los síntomas son expresión de la alteración de las membranas celulares.

La hipovitaminosis E es poco frecuente en humanos. Síntomas de carencia se dan en casos severos de malabsorción de grasas y en la abetalipoproteinemia (falta de LDL). Se observan neuropatías y miopatías similares a las descriptas en animales. Se afectan axones de gran calibre de nervios sensitivos periféricos; hay distrofia axonal en columnas posteriores de la médula espinal y tractos espinocerebelares dorsal y ventral.

En niños malnutridos con bajos niveles de tocoferol en plasma, se reduce la vida media de los eritrocitos. Niños prematuros y recién nacidos de bajo peso corporal, con frecuencia son deficientes en vitamina E, lo que se manifiesta por anemia, reticulocitosis, trombosis y edema; la alimentación artificial no corrige la carencia. La carencia continuada de la vitamina durante las dos primeras décadas de vida produce alteraciones neurológicas serias. Debe instituirse tratamiento con suplementos de tocoferol antes que los daños sean irreversibles.

Acciones farmacológicas. Teniendo en cuenta la reducida toxicidad de la vitamina E se han realizado estudios con gran número de individuos para establecer la eficacia de altas dosis (hasta 1000 mg por día) en la prevención de accidentes cardiovasculares, cáncer, defectos de la respuesta inmune y el deterioro orgánico que acompaña a la vejez, procesos todos relacionados con la acción de species reactivas de oxígeno. Algunos autores refieren efectos favorables, pero hay interrogantes por resolver. Sería apresurado en este momento extraer conclusiones; son necesarias investigaciones adicionales antes de aconsejar el uso de suplementos.

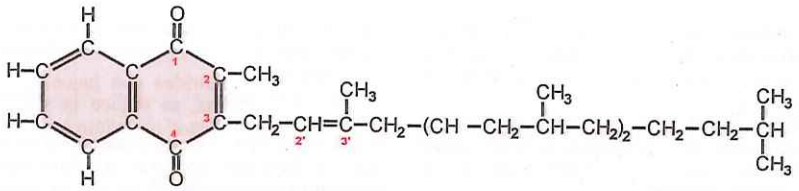
VITAMINA K

Sinonimia. Vitamina antihemorrágica.

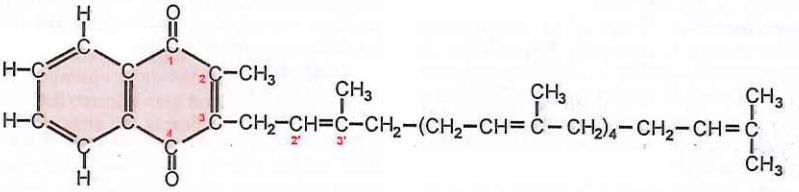
Química. Existen en la naturaleza varios vitámeros, derivados del núcleo naftoquinona; las vitaminas K_1 y K_2 son los más importantes. La K_1 o *filoquinona* es sintetizada por vegetales. Es la 2-metil-3-fitil-1,4-naftoquinona; la cadena lateral fitilo, de 20 carbonos, tiene una doble ligadura entre los C 2'–3' (fig. 27-10).

La K_2 comprende una familia de compuestos sintetizados por bacterias, llamados *menaquinonas*. La cadena está formada por unidades isoprenilo (insaturadas, de 5 C) y difiere en longitud en los distintos miembros de la familia. Se designan con las siglas MK y un número que indica la cantidad de unidades isoprenilo. La cadena puede estar formada por hasta 15 unidades, las más comunes tienen de 6 a 10. La llamada *farnoquinona* o MK-6, es la 2-metil-3-difarnesil-1,4-naftoquinona (fig. 27-10); la cadena lateral difarnesilo posee 30 C. No hay diferencias significativas de actividad entre los distintos vitámeros.

Las vitaminas K son solubles en grasas, estables al calentamiento y a agentes reductores;



2-metil-3-fitil-1,4-naftoquinona (Filoquinona)



Menaquinona-6

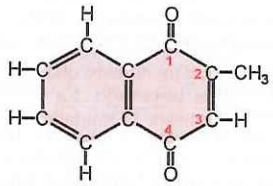
Fig. 27-10. Filoquinona y farnoquinona.

son sensibles a la luz. La actividad se anula por irradiación ultravioleta, álcalis, ácidos fuertes y agentes oxidantes.

El compuesto sintético 2-metil-1,4-naftoquinona, llamado *menadiona* (fig. 27-11), es una provitamina K. Es convertida en MK-4, activa, por adición de una cadena de cuatro unidades isoprenilo en posición 3.

Fuentes naturales. Repollo, coliflor, brócoli, tomate, espinaca, aceites de soja y oliva, son ricos en filoquinona; le siguen los aceites de maní, maíz y girasol. La leche materna es pobre en la vitamina.

Las menaquinonas tienen una distribución más restringida en los alimentos. Las contienen los sometidos a fermentación, como ciertos quesos. Se encuentran también en el hígado.



2-metil-1,4-naftoquinona

Fig. 27-11. Menadiona.

La vitamina K_2 es sintetizada por bacterias de la flora intestinal normal, razón por la cual el ser humano cuenta con un aporte adicional al de los alimentos.

Absorción intestinal. Como para todas las vitaminas liposolubles, requiere que la digestión y absorción de grasas funcionen normalmente. Las menaquinonas producidas por la flora bacteriana contribuyen al aporte nutricional de vitamina K. Se absorben por difusión pasiva en todo el tracto intestinal, incluso en el colon, principal sitio de síntesis bacteriana.

Transporte. Dentro de los enterocitos, la filoquinona y las menaquinonas son incorporadas en los quilomicrones que pasan al sistema linfático y luego a la circulación general, de donde los remanentes son captados por el hígado. La menadiona que se absorbe en intestino llega al hígado por la vena porta.

El tejido hepático es el principal sitio de almacenamiento. Cuando no ingresa cantidad suficiente desde el intestino, las reservas disminuyen rápidamente.

Desde el hígado la vitamina pasa a la circulación con las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), que transfieren una parte a HDL.

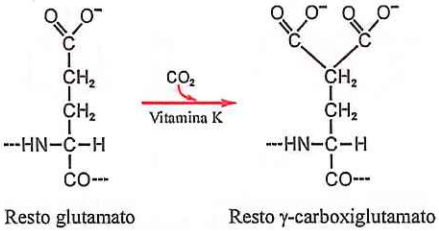


Fig. 27-12. γ-carboxilación de un resto glutamato.

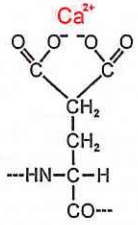


Fig. 27-13. Acción quelante del γ-carboxilato.

Metabolismo. La vitamina K es metabolizada en el hígado. La filoquinona es degradada más lentamente que las menaquinonas. La menadiona es transformada en MK-4 en los hepatocitos.

Papel funcional. La vitamina K participa como coenzima en reacciones de carboxilación de diversas proteínas llamadas proteínas *Gla,* entre las que se cuentan *protrombina* (factor II), *proconvertina* (factor VII), *componente de tromboplastina del plasma* (factor IX o de Christmas) y *factor Stuart-Prower* (factor X), todas procoagulantes; *proteínas S, C* y *Z,* de acción anticoagulante (ver Cap. 30); *osteocalcina* y *proteína Gla de la matriz del tejido óseo* y otras identificadas en varios tejidos.

Estas proteínas son sometidas, postraducción, a carboxilación en el carbono γ de restos glutamilo (Glu), que se convierten en γ-carboxiglutamilo (Gla) (fig. 27-12).

Los restos γ-carboxiglutamato tienen importancia funcional; sirven como quelantes de iones calcio (fig. 27-13) e interactúan con fosfolípidos en la superficie de membranas.

La γ-carboxilación de residuos glutamato es catalizada por γ-*carboxilasa dependiente de vitamina K*, localizada en membranas del retículo endoplásmico. La forma reducida de la vitamina K (KH_2, hidroquinona) actúa como cofactor. Se agrega CO_2 al carbono γ de residuos glutamilo. Se forma vitamina K-2,3-epóxido. La hidroquinona

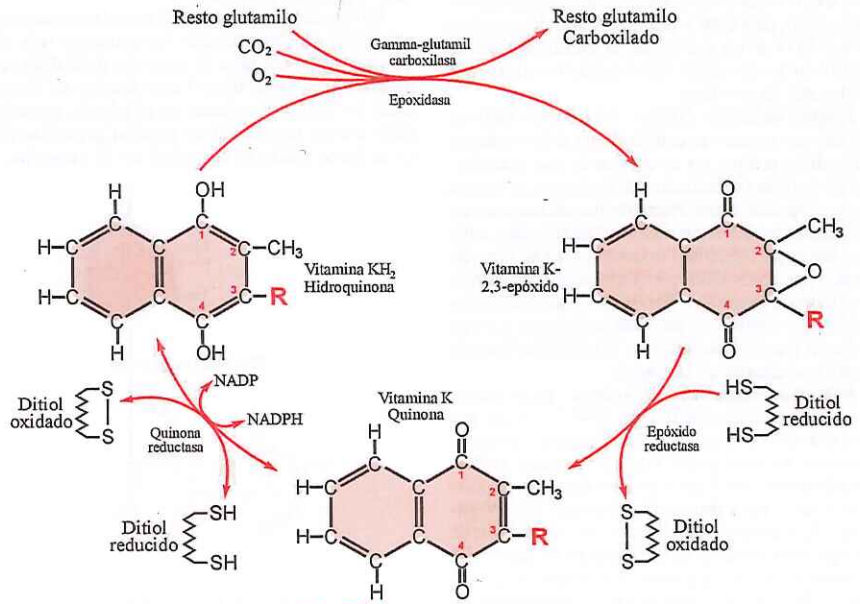


Fig. 27-14. Ciclo de la vitamina K.

es continuamente regenerada en el llamado *ciclo de la vitamina K* (fig. 27-14), con dos etapas catalizadas por reductasas. En la primera, el epóxido es reducido a quinona por la *vitamina K-2,3-epóxido reductasa* y a continuación la *vitamina K quinona reductasa* cataliza la formación de hidroquinona.

Vitamina K y coagulación. Desde su descubrimiento, la vitamina K fue relacionada con la coagulación de la sangre, proceso que comprende una serie de reacciones en cascada, en el cual intervienen más de doce proteínas, fosfolípidos de membrana e iones Ca^{2+} (pág. 695). De las proteínas procoagulantes, cuatro son dependientes de vitamina K (protrombina o factor II y los factores VII, IX y X). Son sintetizadas en hígado, γ-carboxiladas y secretadas a la circulación como zimógenos inactivos. Otras proteínas dependientes de vitamina K relacionadas con la coagulación son las S, C y Z, que actúan como frenos de la coagulación. Así, la vitamina K participa en la síntesis de proteínas activadoras e inhibidoras, pero prima el efecto procoagulante. En la deficiencia de vitamina K aparecen en circulación proteínas Gla subcarboxiladas, o *proteínas inducidas por ausencia de vitamina K* (PIAVK), sin actividad.

Inicialmente se pensó que las funciones de la vitamina K se limitaban a la γ-carboxilación de restos glutamato en factores de la coagulación, pero posteriormente se comprobó la existencia de proteínas Gla en diversos tejidos, como hueso, riñón, bazo, placenta y pulmón. Cuando se aclare la función de estas proteínas, la vitamina K ha de adquirir una relevancia funcional más amplia que la asignada hasta ahora.

Requerimientos. (Tabla 27-1). No es fácil establecer con certeza la cantidad que debe ingerirse con la dieta porque no se conoce la real contribución de la flora bacteriana. Sin embargo, se estima que la proporción absorbida de las menaquinonas sintetizadas en intestino no es suficiente para satisfacer los requerimientos normales. No se han observado efectos tóxicos producidos por altas dosis de vitámeros naturales. En cambio, la menadiona (sintética) y derivados, en dosis superiores a 5 mg, producen anemia hemolítica, hiperbilirrubinemia y hasta kernícterus en lactantes.

Antivitaminas. El *dicumarol* [3,3'-metilbis-(4-hidroxicumarina)] (fig. 27-15) es un antagonista de la vitamina K; interfiere competitivamente su asociación con la vitamina K-2,3-epóxido reductasa. Fue el primer fármaco utilizado en clínica para prolongar el tiempo de coagulación. Actualmente se dispone de sustancias de este tipo utilizadas en el tratamiento de pacientes con tendencia a coagulación intravascular (trombosis). Uno de los antagonistas empleados en

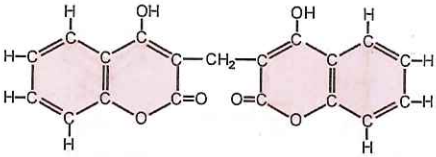


Fig. 27-15. Dicumarol.

tratamientos prolongados es la *warfarina* [(3-α-acetonilbencil)-4-hidroxicumarina] (Fig. 27-16), usada también como raticida.

Avitaminosis. La deficiencia resulta en insuficiente γ-carboxilación de proteínas Gla. Las personas carenciadas tienen gran tendencia a sangrar, aun por pequeñas heridas.

En humanos adultos, la avitaminosis K es rara gracias a la relativa abundancia de vitamina en los alimentos comunes y al aporte adicional de menaquinonas sintetizadas por bacterias en intestino. Las deficiencias pueden producirse por: a) Absorción deficiente. En la mayoría de casos se debe a falta de sales biliares en intestino y a otras condiciones que determinan malabsorción severa de grasas. b) En pacientes mal alimentados sometidos a tratamientos prolongados con antibióticos, es posible que se elimine o reduzca la flora intestinal y con ella la provisión de menaquinonas. Algunos antibióticos, como cefalosporinas, actúan de manera similar a los anticoagulantes cumarínicos.

Diversos factores determinan hipovitaminosis en recién nacidos durante los primeros seis días de vida: a) la vitamina K pasa con dificultad de la madre al feto, que tiene bajos niveles de filoquinona en sangre y tejidos; b) el hígado inmaduro tiene escasa capacidad de generar proteínas Gla; c) la leche materna es pobre en la vitamina; d)

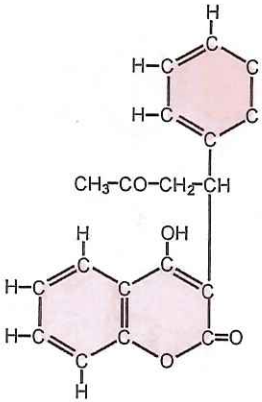


Fig. 27-16. Warfarina.

el intestino del recién nacido es estéril, no hay síntesis por bacterias durante los primeros días de vida; la flora empieza a desarrollarse después de iniciada la ingestión de alimentos. La protrombinemia es baja en el momento del nacimiento y disminuye aún más, hasta alcanzar su valor mínimo al tercer día de vida. Los riesgos son aún mayores en niños de bajo peso o prematuros.

La deficiencia de vitamina K en el recién nacido produce la llamada *enfermedad hemorrágica del recién nacido*, que actualmente prefieren llamar *hemorragia por deficiencia de vitamina K*. Hay hematomas en cráneo, tórax y abdomen, hemorragias gastrointestinales y nasales. Aunque la incidencia de esta enfermedad es baja, es común practicar tratamiento preventivo con filoquinona por vía oral durante varios días a partir del nacimiento. Como alternativa se aconseja una dosis (1 mg) por vía intramuscular inmediatamente después del parto.

Acciones farmacológicas. Algunas evidencias indicaron efectos favorables de la administración de menaquinonas en la mineralización ósea. En Japón se realizó un estudio en gran número de mujeres posmenopáusicas que padecían osteoporosis. Se han descrito buenos resultados, con aumento de la densidad ósea y reducción de la incidencia de fracturas, pero se requieren aún estudios adicionales. Una dosificación similar con filoquinona no da los mismos resultados.

VITAMINAS HIDROSOLUBLES

COMPLEJO VITAMÍNICO B

El "factor hidrosoluble B" inicialmente considerado una sola sustancia, en realidad es una mezcla de distintos componentes. A medida que se los aislaba eran designados con la letra B y un subíndice. Actualmente se prefieren nombres relacionados con la estructura química o la fuente de origen. El llamado *complejo vitamínico B* incluye: *tiamina* (B_1), *riboflavina* (B_2), *niacina* (B_3), *ácido pantoténico* (B_5), *piridoxina* (B_6), *biotina* (B_7), *ácido fólico* (B_9) y *cobalamina* (B_{12}).

Estas vitaminas se encuentran con frecuencia juntas en las fuentes naturales, razón por la cual las deficiencias casi nunca son puras, de un solo factor, sino de varios.

Todos los integrantes del complejo B son coenzimas o forman parte de coenzimas.

Cuando se someten alimentos a cocción en un medio acuoso, las vitaminas hidrosolubles pasan al agua. Para conservarlas, no debe desecharse el líquido, sino utilizarlo en la preparación culinaria.

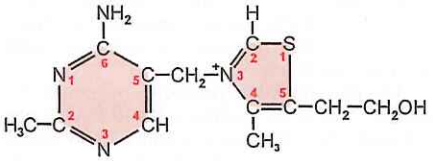


Fig. 27-17. Tiamina.

TIAMINA

Sinonimia. Vitamina B_1, aneurina, factor antineurítico, factor antiberibérico.

Química. La tiamina es una sustancia cristalina, incolora, muy soluble en agua, ligeramente soluble en alcohol, insoluble en éter o cloroformo, estable al calor seco; en solución ácida resiste temperaturas de 120°C a 130°C. En medio alcalino, el calentamiento en contacto con el aire produce degradación de la vitamina.

Es sintetizada por vegetales en presencia de luz y por diversas bacterias y levaduras.

Formada por una pirimidina (4'-amino-2'-metilpirimidina) unida a un núcleo tiazol (4-metil-5-hidroxietiltiazol) por un puente metileno ($-CH_2-$). En la posición 5 del tiazol se inserta una cadena de dos carbonos con un alcohol primario (fig. 27-17) que forma ésteres con uno, dos o tres fosfatos.

El monofosfato (TMP) es inactivo; el difosfato o *pirofosfato de tiamina* (TPP) (fig. 27-18) actúa como coenzima; es la forma más abundante. El *trifosfato* (TTP) está relacionado con la transmisión del impulso nervioso.

Fuentes naturales. La vitamina B_1 se encuentra en alimentos vegetales y animales. Las mejores fuentes son cereales (granos enteros), levadura de cerveza y carne porcina. Yema de huevo, hígado, riñón, nueces, maní y espárragos tienen algo menos. La leche y las frutas son pobres en esta vitamina.

La molienda de cereales separa la corteza (salvado) y con ella más del 80% de la tiamina contenida en el grano entero. La harina y el pan blancos tienen muy bajo contenido de tiamina; la harina integral la conserva.

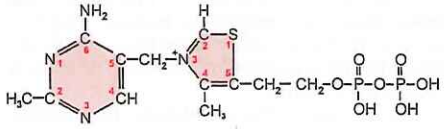


Fig. 27-18. Pirofosfato de tiamina.

En tejidos animales, más del 90% de la tiamina está fosforilada, con predominio de pirofosfato; en los cereales, se encuentra en su mayor parte libre, no fosforilada.

Algunos mariscos, pescados, vegetales (helechos) y bacterias contienen *tiaminasa*, enzima que desdobla la tiamina y la anula como vitamina. La tiaminasa es inactivada por la cocción. La ingesta de mariscos o pescado crudos puede provocar avitaminosis.

Absorción intestinal. Los fosfatos de tiamina de los alimentos son hidrolizados por fosfatasas. La tiamina libre se absorbe en la porción proximal de intestino delgado. El té y el café contienen polifenoles (flavonoides, ácido tánico y cinámico) que interfieren la absorción.

En los enterocitos la tiamina es fosforilada a monofosfato (TMP) y difosfato (TPP), lo que "atrapa" a la vitamina en la célula, pero no se almacena, sino que luego se desfosforila a tiamina y TMP y pasa a la sangre.

Transporte. La tiamina llega al hígado por vía portal, luego se distribuye a todos los tejidos unida a albúmina.

Metabolismo. En los tejidos, tiamina y TMP son convertidos en TPP por la *tiamina pirofosfoquinasa*, que transfiere pirofosfato desde ATP. En sistema nervioso, parte del TPP es convertido en trifosfato (TTP) por *pirofosfato de tiamina-ATP fosforiltransferasa*. Una *tiamina trifosfatasa* hidroliza TTP.

La reserva de tiamina es pequeña, razón por la cual, cuando la ingesta es insuficiente, la falta en los tejidos se produce rápidamente.

El grupo pirofosfato del TPP es hidrolizado por fosfatasas. Cuando el aporte es normal, se excreta pequeña cantidad de tiamina (libre o esterificada con sulfato) por orina; cuando se ingiere la vitamina por encima de los requerimientos, el exceso se elimina rápidamente, sin modificar.

Papel funcional. La tiamina desempeña un papel muy importante en el metabolismo intermedio en todas las células. La forma activa es el pirofosfato de tiamina (TPP).

Reacciones de descarboxlación oxidativa. El TPP es una de las coenzimas de tres sistemas multienzimáticos que catalizan la descarboxilación oxidativa de α-cetoácidos. Dos de esos sistemas, las *deshidrogenasas de piruvato* y *de α-cetoglutarato*, cumplen su función en vías proveedoras de energía; la tercera, *deshidrogenasa de α-cetoácidos de cadena ramificada*, descarboxila α-cetoácidos derivados de leucina, isoleucina y valina.

Reacciones de transcetolación. El pirofosfato de tiamina es coenzima de *transcetolasas*, que transfieren el grupo cetol de dos carbonos (-CO-CH_2OH) desde una cetosa donante a una aldosa aceptora (ver pág. 276).

Alfa-oxidación y escisión de ácidos grasos en peroxisomas. Recientemente se han descrito sistemas multienzimáticos que requierenTPP, localizados en peroxisomas, que catalizan la α-oxidación y escisión de 3-metil-ácidos grasos y la ruptura de 2-hidroxiácidos grasos de cadena lineal.

Funciones regulatorias. Otra función propuesta para el TPP es la modulación de vías metabólicas con él relacionadas. En zonas no codificantes de ARNm existen estructuras que reconocen y fijan TPP (*riboswitches*) e interrumpen la transcripción o la traducción.

Funciones del TTP. Como trifosfato, la tiamina actuaría en funciones muy distintas de las del pirofosfato. El TTP se encuentra en sistema nervioso y músculo esquelético. Está relacionado con la transmisión del impulso nervioso. Una prueba de la importancia funcional de este compuesto es la existencia de un trastorno grave del sistema nervioso central, la *enfermedad de Leigh* o *encefalomielopatía necrotizante subaguda*, en la cual hay disminución del nivel de TTP en cerebro, debida a una alteración genética que afecta su síntesis.

Requerimientos. (Tabla 27-1). Las necesidades están condicionadas por las características de la dieta. La ingesta exagerada de hidratos de carbono las aumenta. Se aconseja suministrar 0,5 mg de tiamina por cada 1.000 Calorías de alimento ingerido.

Los alcoholistas también requieren mayor cantidad; el etanol interfiere la absorción de la vitamina.

En estados patológicos como hipertiroidismo y fiebre prolongada, la demanda de tiamina está aumentada.

Avitaminosis. En humanos los efectos de la hipovitaminosis B_1 son muy generales. Se presenta anorexia, pérdida de peso, trastornos gastrointestinales, cardiocirculatorios, neuropatías periféricas y centrales, debilidad muscular, polineuritis periférica simétrica.

La carencia grave provoca un cuadro clínico llamado *beriberi*. Esta enfermedad era común en el Lejano Oriente, donde muchas personas se alimentaban casi exclusivamente con arroz sin corteza.

La enfermedad comienza con sensación de debilidad y fatiga, cefaleas, insomnio, mareos, inapetencia, taquicardia. Posteriormente se agregan síntomas que permitieron describir varios cuadros: a) *Beriberi seco*, los síntomas dominantes son de orden neurológico. b) *Beriberi húmedo*, predominio de trastornos circulatorios, con

edemas en miembros inferiores y derrames en cavidades serosas. c) *Beriberi agudo grave*, el órgano más afectado es el corazón; puede sobrevenir muerte por paro cardíaco. d) *Beriberi mixto*, con síntomas correspondientes a las primeras dos categorías. En casi todos los casos hay disfunción del sistema nervioso autónomo. En la práctica no se observa una diferenciación clínica tan precisa, razón por la cual se tiende a abandonar la clasificación mencionada.

También se presenta beriberi en lactantes de madres carenciadas. Los síntomas más notables son rigidez corporal, constipación, oliguria, debilidad, edema, agrandamiento del corazón, cianosis, pulso rápido e irregular.

El beriberi suele acompañarse de síntomas carenciales de otras vitaminas del complejo B, ya que frecuentemente las avitaminosis comprenden a varios de los factores del grupo.

En plasma sanguíneo y orina de enfermos con beriberi hay incremento de ácido pirúvico y su derivado, el ácido láctico. Si bien esto es nocivo para el sistema nervioso y miocardio, no es el único factor responsable de la polineuritis. Otra consecuencia metabólica de la falta de tiamina es la reducción de acetil-CoA y con ella de la síntesis de acetilcolina y de otros neurotransmisores.

Es probable que la falta de TTP contribuya a la producción de los trastornos en sistema nervioso.

Actualmente la avitaminosis grave no es frecuente, pero existen grupos humanos en riesgo de padecerla. Por ejemplo, se manifiesta en ancianos; además la hipovitaminosis es un hallazgo frecuente en alcoholistas; el abuso crónico de alcohol altera la absorción y utilización de la tiamina. En muchos de estos pacientes el problema se agrava porque frecuentemente se suma una mala alimentación. En la deficiencia de los alcoholistas, la sintomatología más notable es producida por lesiones en el sistema nervioso central que determinan el llamado *síndrome de Wernicke-Korsakoff*.

Se observa hipovitaminosis B_1 en casos de vómitos y diarreas persistentes, en la insuficiencia renal tratada con diálisis crónica, en la malabsorción intestinal, en pacientes con tasa metabólica aumentada (hipertiroidismo, procesos febriles prolongados).

Usos terapéuticos. La administración de tiamina sólo se justifica en casos de deficiencia.

RIBOFLAVINA

Sinonimia. Vitamina B_2, lactoflavina.

Química. Se presenta como cristales color amarillo naranja, poco solubles en agua e insolubles en solventes orgánicos; se comporta como una base débil. Es estable al calor y degradada por exposición a la luz.

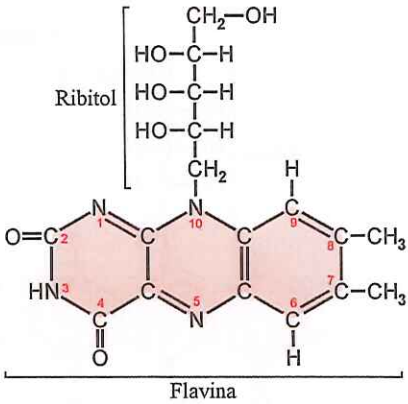


Fig. 27-19. Riboflavina.

La riboflavina o vitamina B_2 está compuesta por dimetilisoaloxazina (núcleo tricíclico flavina) unida a un resto D-ribitol, polialcohol derivado de ribosa; es la 7,8-dimetil-10-(1'-D-ribitil) isoaloxazina (fig. 27-19).

La esterificación con fosfato del alcohol primario del carbono 5' del ribitol forma un monofosfato llamado *flavina mononucleótico* (FMN) (fig. 27-20); la adición a éste de adenosil fosfato da riboflavina-5'-adenosildifosfato, llamado *flavina adenina dinucleótico* (FAD) (fig. 27-21).

Fuentes naturales. Los alimentos de origen animal son más ricos en riboflavina que los vege-

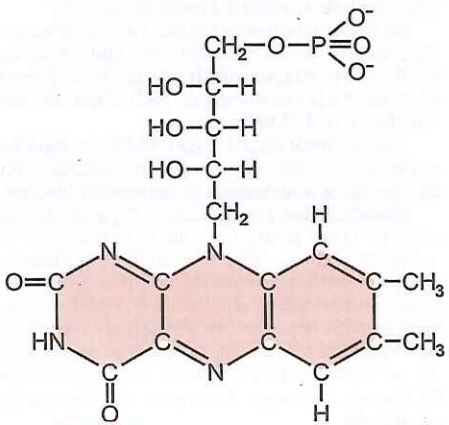


Fig. 27-20. Flavina mononucleótido (FMN).

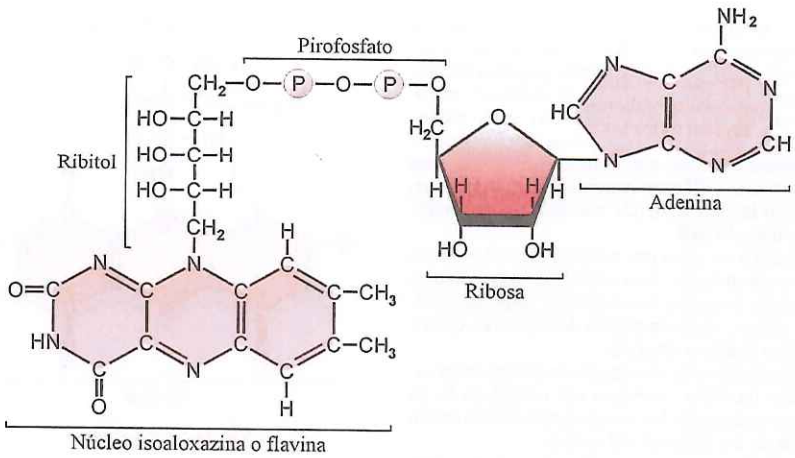


Fig. 27-21. Flavina adenina dinucleótido (FAD).

tales. La leche y productos lácteos son la fuente más importante. También hígado, riñón, carnes, y yema de huevo; entre los vegetales, espinaca, tomate, zanahoria, brócoli, espárragos y legumbres. Los cereales, aun enteros, y las frutas son muy pobres en riboflavina. En la leche y huevos una buena proporción de la vitamina está libre; en otros alimentos se encuentra como FMN y FAD unidos a proteínas.

Absorción intestinal. El medio ácido del estómago y las proteasas en la luz gástrica e intestinal liberan FAD y FMN, que luego son hidrolizados para dar riboflavina libre. La flora bacteriana de intestino grueso sintetiza riboflavina. La vitamina ingresa a todo lo largo del intestino delgado.

En los enterocitos la *flavina quinasa* le transfiere fosfato de ATP y convierte riboflavina en FMN, que es atrapada dentro de la célula. Luego se forma FAD por acción de *FAD sintetasa*, por transferencia de AMP desde ATP.

Previa hidrólisis del FAD y FMN, la vitamina atraviesa la membrana basolateral mediante un transportador semejante al de membrana luminal.

Metabolismo. La riboflavina llega por la circulación portal al hígado y luego se distribuye a todos los tejidos, unida a albúmina y a globulinas, principalmente inmunoglobulinas. En las células, es nuevamente convertida en FMN y FAD, incorporados como grupos prostéticos a diversos sistemas enzimáticos. En la mayoría de los tejidos el 80% o más del total se encuentra como FAD unido a enzimas. La reserva de vitamina B_2 es pequeña.

La vitamina libre en la circulación es filtrada en los glomérulos renales y reabsorbida en los túbulos. Sólo cuando hay un exceso en sangre se elimina por orina. Una hora o menos después de haber ingerido un suplemento de 1,5 a 2 mg de vitamina B_2, se advierte su aparición en la orina, que adquiere color anaranjado.

Papel funcional. La riboflavina integra las coenzimas FMN y FAD, en las que actúa como portadora de electrones. La isoaloxazina es el aceptor/dador de hidrógenos (fig. 9-8).

Diversas flavoenzimas intervienen en muchas reacciones que abarcan deshidrogenaciones, hidroxilaciones y descarboxilaciones oxidativas; también actúan como coenzimas de oxidasas y oxigenasas. Es mucho mayor el número de las dependientes de FAD que las ligadas a FMN.

Existe relación entre riboflavina y otras vitaminas del complejo B; por ejemplo, la piridoxina, niacina y ácido fólico. Las flavinas integran oxidasas de función mixta asociadas a citocromo P_{450} y NADP, amino-N-oxidasas y S-oxidasas.

Requerimientos. (Tabla 27-1). La dieta normal provee fácilmente la cantidad necesaria. La reserva en el organismo es pequeña y se agota rápidamente en casos de insuficiente aporte. No se han observado efectos tóxicos de la riboflavina.

Avitaminosis. A pesar del papel fundamental de la riboflavina, los signos clínicos de deficiencia son poco específicos. La avitaminosis es raramente letal. No existe una enfermedad definida causada por la falta de riboflavina. Muchos de los

síntomas de la llamada *arriboflavinosis* son también observados en carencias de otras vitaminas del complejo B.

En humanos se han descripto los siguientes síntomas: cansancio, edema de mucosas bucal y faríngea, inflamación de la lengua (glositis) y labios (queilitis), lesiones en la comisura de los labios (queilosis) y en surcos nasogenianos y retroauriculares, alteraciones cutáneas (dermatitis seborreica, queratosis folicular) y manifestaciones oculares (conjuntivitis, fotofobia e inflamación de la córnea).

La principal causa de hiporriboflavinosis es una alimentación insuficiente, pero también pueden provocarla fallas de absorción intestinal. La ingesta exagerada de alcohol interfiere la absorción de riboflavina en el tracto digestivo.

NIACINA

Sinonimia. Ácido nicotínico, nicotinamida, factor preventivo de pelagra, factor PP. También se la llama vitamina B_3, nombre que tiende a abandonarse.

Química. La designación *niacina* es aplicable tanto al *ácido nicotínico* (ácido 3-piridincarboxílico) como a su amida, la *nicotinamida*; ambos vitámeros derivan del núcleo piridina (figs. 27-22).

El ácido nicotínico puede obtenerse por oxidación de la nicotina; de allí su nombre. Se presenta en cristales incoloros con forma de agujas, es poco soluble en agua o alcohol e insoluble en solventes orgánicos; es estable al calentamiento, aun en contacto con el aire. La amida del ácido nicotínico también cristaliza en agujas incoloras, es muy soluble en agua y termoestable.

Las formas funcionales son nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP). El NAD está formado por nicotinamida y adenosil-difosfato-

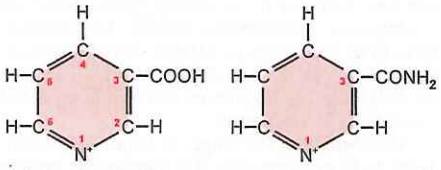


Fig. 27-22. Vitámeros de niacina.

ribosa unidos por enlace (β-glicosídico) de alta energía desde el C1" de la ribosa al N1 de la nicotinamida (fig. 27-23). En el NADP se agrega un grupo fosfato al C2' de ribosa (fig. 27-23). En su forma oxidada, se representa a las coenzimas con la notación NAD^+ y $NADP^+$.

Fuentes naturales. Hígado y carnes son ricos en niacina; también se encuentra en huevos, granos de cereales enteros, legumbres, maní, frutas, café, té y, en menor cantidad, en la leche. El trigo entero es una fuente excelente pero la mayor parte de la vitamina se pierde en la molienda. El aporte de niacina de los vegetales de la dieta habitual es pobre porque se encuentra unida a macromoléculas (polisacáridos, glicopéptidos); sólo es disponible después de tratamiento en medio alcalino. Una dieta vegetariana estricta suele ser deficiente.

Triptófano como fuente de ácido nicotínico. En hígado se sintetiza ácido nicotínico a partir del aminoácido triptófano (pág. 349). Los alimentos ricos en triptófano (carnes, leche, huevos) aseguran provisión de la vitamina. Nunca se observan deficiencias serias cuando la dieta incluye proteínas animales. La mayoría de estas proteínas contienen alrededor de 1% de triptófano. Cada 60 mg de triptófano consumidos producen aproximadamente 1 mg de ácido nicotínico.

Absorción intestinal. Los nucleótidos de nicotinamida de los alimentos son hidrolizados en

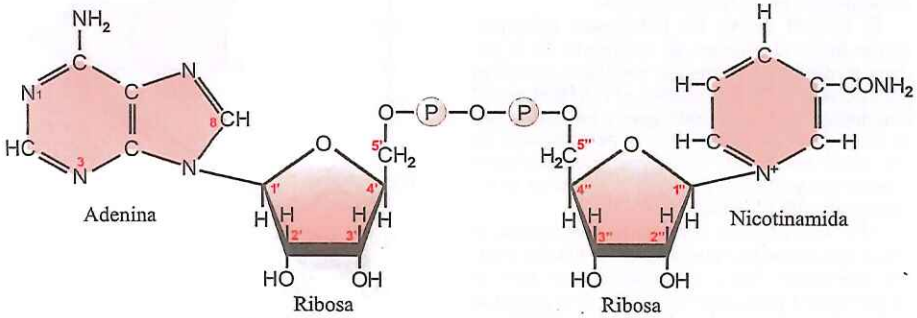


Fig. 27-23. Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD).

intestino para dar nicotinamida mononucleótido y adenosina monofosfato (AMP). La nicotinamida libre y el ácido nicotínico ingresan rápidamente a través de la mucosa intestinal. Dentro del enterocito, la niacina es convertida en NAD o enviada a la vena porta.

Metabolismo. En sangre la forma más abundante es la nicotinamida. La mayoría de tejidos captan tanto nicotinamida como ácido nicotínico por difusión simple y rápidamente se forma NAD. La mayoría de tejidos sintetiza NAD y NADP preferentemente a partir de nicotinamida. El NAD, en reacción que requiere ATP, es fosforilado en el carbono 2' de la ribosa correspondiente al nucleótido de adenina para dar nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP). La concentración de NAD en las células es mayor que la de NADP; el NAD se encuentra predominantemente en su forma oxidada (NAD^+), en cambio, el NADPH es más abundante que el $NADP^+$.

Papel funcional. Nicotinamida es el vitámero que integra las moléculas de NAD y NADP. El papel inicialmente reconocido a estos compuestos es el de actuar como coenzimas de oxidorreductasas.

Oxidorreducciones. NAD y NADP son aceptores/dadores de hidrógenos. En las deshidrogenaciones catalizadas por enzimas dependientes de NAD o NADP se sustraen al sustrato dos hidrógenos y la coenzima adquiere su forma reducida (NADH + H^+ y NADPH + H^+) (Fig. 9-6).

El NAD es utilizado por numerosas enzimas, también integra los sistemas multienzimáticos de descarboxilación oxidativa (deshidrogenasas de piruvato, de α-cetoglutarato y de α-cetoácidos de cadena ramificada).

El NADP actúa como coenzima en dos etapas de la vía de pentosa fosfato, en la reacción de la enzima málica, que participa en la lanzadera de citrato, y en hidroxilaciones de oxigenasas de función mixta asociadas a citocromo P_{450}. En eritrocitos, el NADPH contribuye a mantener la hemoglobina en su estado reducido.

El NADH deriva los hidrógenos principalmente hacia el sistema de transporte de la cadena respiratoria; la energía resultante se utiliza para generar ATP. En cambio, el NADPH preferentemente transfiere hidrógenos en reacciones de biosíntesis (de ácidos grasos, de colesterol, de hormonas esteroides, de desoxirribonucleótidos y otros compuestos); participa también en la regeneración del glutatión.

ADP-ribosilación. Durante mucho tiempo se pensó que todas las funciones de la niacina estaban vinculadas sólo a oxidorrducciones, pero se ha probado la participación del NAD en procesos designados de *ADP-ribosilación*. En el NAD, se separa la nicotinamida y el resto *ADP-ribosilo* puede unirse a una variedad de aceptores. Se conocen distintos tipos de reacciones de de ADP-ribosilación, descritas en pág. 478. También se consideran variantes de la ADP-ribosilación la formación de ADP-ribosa cíclico y la formación de ácido nicotínico-ADP-ribosa fosfato (NAADP).

ADP-ribosa cíclico. Una reacción catalizada por *ADP-ribosa-ciclasa* libera nicotinamida del NAD y establece una unión glicosídica entre ribosa y el N1 de la adenina para formar una estructura cíclica (fig. 27-24). Puede considerarse como una auto ADP-ribosilación del resto ADP-ribosilo o, en otros términos, una ADP-ribosilación intramolecular.

El antígeno CD38 de superficie de leucocitos es una ectoenzima que posee actividad de ADP-ribosa-ciclasa y también contribuye, como hidrolasa, a la ruptura del ciclo.

El ADP-ribosa cíclico es un movilizador de calcio desde los depósitos en las cisternas del retículo endoplásmico, promoviendo la apertura de los canales receptores de rianodina tipo II y III.

NAADP. El ácido nicotínico-ADP-ribosafosfato (fig. 27-25) es formado por reacción entre NADP y ácido nicotínico, que también puede considerarse una variante de ADP-ribosilación en la cual el aceptor es ácido nicotínico; queda nicotinamida en libertad. Se cree que la misma enzima que forma ADP-ribosa cíclico sería responsable de la producción de NAADP (del inglés *nicotinic acid-ADP-ribosa fosfato*).

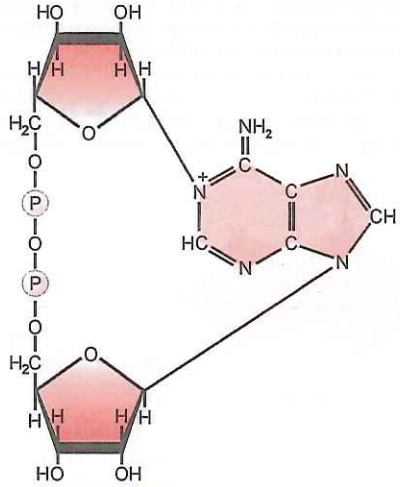


Fig. 27-24. ADP-ribosa cíclico.

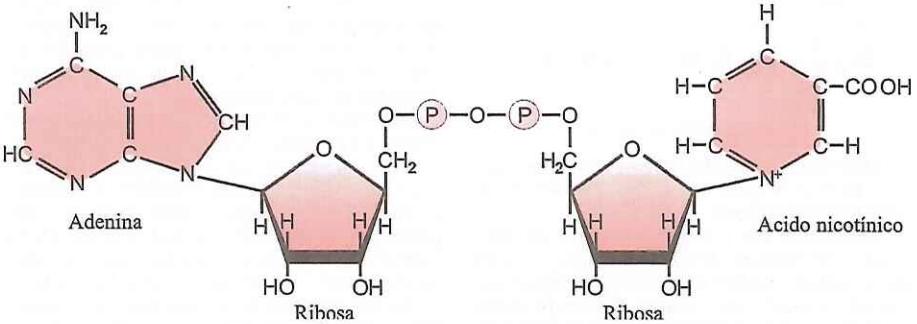


Fig. 27-25. Ácido nicotínico-ADP-ribosafosfato (NAADP).

El NAADP es un potente agente de movilización de calcio de depósitos intracelulares. En algunas células actúa sobre canales receptores de rianodina y en otras provoca eflujo de calcio de vesículas acídicas (lisosomas?). Se ha comprobado que el NAADP promueve la liberación de calcio en las células β del páncreas durante la respuesta a la glucosa, en las células de músculo liso en su repuesta a endotelina y en las células acinares del páncreas exocrino en su respuesta a la colecistoquinina.

Requerimientos. (Tabla 27-1). Como el triptófano genera niacina, la cantidad de ésta se expresa en equivalentes, que corresponden a 1 mg de niacina o 60 mg de triptófano.

Avitaminosis. La falta de ácido nicotínico o de nicotinamida produce una enfermedad conocida con el nombre de *pelagra*. Ocurre en pueblos asolados por la guerra y en situaciones en las cuales la provisión de alimentos es pobre, particularmente en proteínas de buena calidad.

El cuadro se caracteriza por lesiones cutáneas, principalmente en zonas expuestas al roce o al sol. Las lesiones son simétricas; en el rostro toman ambas mejillas y la región nasal (dermatitis en mariposa), también dorso de las manos, rodillas y codos; en el cuello rodean la zona inferior (collar de Casal). La piel se presenta inicialmente enrojecida, luego hay descamación e hiperpigmentación. A las lesiones dérmicas se suman trastornos en el tracto digestivo; inflamación de la lengua (glositis) y mucosa bucal (estomatitis), náuseas, vómitos, aclorhidria, enteritis y diarreas. Si la carencia no se corrige, aparecen síntomas neurológicos, mentales. Los pacientes sufren cefalea, apatía, insomnio, pérdida de memoria, psicosis depresiva, delirios, alucinaciones y demencia. El cuadro de pelagra no tratado lleva a la muerte.

La interrelación funcional de niacina, riboflavina y piridoxina explica la producción de cuadros "pelagroides" por deficiencia de cualquiera de esos factores. La deficiencia de riboflavina o piridoxina reduce significativamente la producción de niacina a partir de triptófano.

Cuando sólo se conocía el papel de la niacina como integrante de coenzimas se atribuyó a las fallas en las reacciones de oxidorreducción y generación de energía toda la patología producida por la avitaminosis. Sin embargo, algunos síntomas de la pelagra, como los neurológicos y dermatológicos, es posible que estén relacionados con las fallas en la ADP-ribosilación y movilización de calcio en las células.

Acciones farmacológicas. Diversos estudios han mostrado que la administración de muy altas dosis de ácido nicotínico (2 a 6 g por día) tiene acción beneficiosa en dislipidemias y reduce la mortalidad en pacientes ateroscleróticos, con alto riesgo de accidentes cardiovasculares. Este tratamiento disminuye el colesterol y triacilglicéridos en plasma, reduce las VLDL, LDL, y lipoproteínas Lp(a) e incrementa las HDL. Sólo el ácido nicotínico ejerce estos efectos; la nicotinamida no tiene acción alguna sobre la lipemia.

Las megadosis de ácido nicotínico no son bien toleradas, producen vasodilatación intensa (*flushing*), con rubor y ardor en la piel de la mitad superior del cuerpo; a veces se agregan náuseas y vómitos.

Por su parte, la nicotinamida a altas dosis protege contra la muerte celular e inhibe la producción de mediadores inflamatorios. También potencia los efectos citotóxicos de la quimioterapia y radioterapia.

ÁCIDO PANTOTÉNICO

Sinonimia. Factor antidermatitis del pollo; también se la llama vitamina B_5, denominación poco usada.

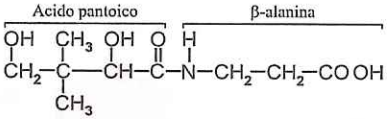


Fig. 27-26. Ácido pantoténico.

Química. Es líquido, viscoso, de color amarillo, soluble en agua; los ácidos, los álcalis y el calor lo descomponen.

Constituido por β-*alanina* y *ácido pantoico* (ácido 2,4-dihidroxi-3,3-dimetilbutírico) unidos por un enlace amídico (fig. 27-26). El organismo humano es incapaz de sintetizar el ácido pantoico.

El ácido pantoténico integra los productos activos 4'-fosfopanteteína y coenzima A. La panteteína se obtiene agregando β-mercaptoetilamina al carboxilo libre del ácido pantoténico (fig. 27-27). La CoA está formada por panteteína y un puente pirofosfato a adenosina-3-monofosfato.

Fuentes naturales. El nombre pantoténico (del griego *pantos*: en todas partes) indica su amplia distribución en tejidos animales y vegetales. En los alimentos la mayor parte se encuentra integrando la molécula de coenzima A; en menor proporción, como panteteína y 4'-fosfopanteteína.

Hígado, riñón, corazón, carnes bovina y de pollo, yema de huevo, arvejas, repollo, batata, brócoli, legumbres, granos enteros, maní, hongos y levadura son ricos en ácido pantoténico. Papas, tomates, leche y otros alimentos animales y vegetales contienen algo menos. Su relativa abundancia en los alimentos hace prácticamente imposible que una dieta, aun restringida, no provea la cantidad requerida de ácido pantoténico.

Las bacterias del colon sintetizan ácido pantoténico; no se conoce la cantidad que se absorbe.

En los alimentos es escasa la cantidad de ácido pantoténico libre; alrededor del 85% se encuentra como CoA y casi todo el resto, como 4'-fosfopanteteína. Ambos deben ser hidrolizados. De los enterocitos, el ácido pantoténico pasa a la circulación portal y se distribuye a todos los tejidos.

En las células el ácido pantoténico es convertido en 4'-fosfopanteteína. La *coenzima A sintasa* cataliza una serie de reacciones que llevan a la síntesis de CoA.

La *proteína transportadora de acilos* (PTA) está formada por un polipéptido de unos 8.600 Da y 4'-fosfopanteteína. Se incorpora como un dominio del complejo ácido graso sintasa (pág. 308).

Papel funcional. La CoA desempeña un papel central en el metabolismo de carbohidratos y lípidos; está comprometida en numerosas reacciones tanto de síntesis como degradativas.

La PTA es el brazo flexible que conduce ordenadamente la cadena del ácido graso en formación de uno a otro sitio catalítico del complejo ácido graso sintasa.

La combinación de acilos con el grupo –SH de coenzima A o fosfopanteteína de la proteína

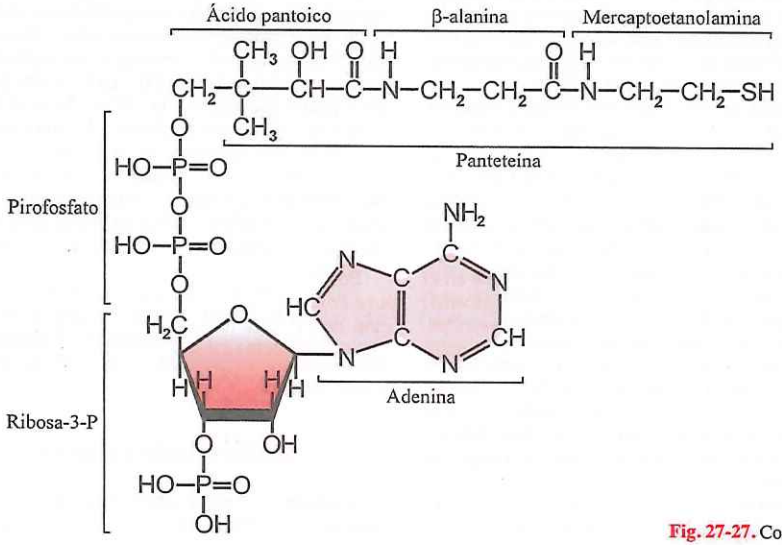


Fig. 27-27. Coenzima A.

transportadora (PTA) es de tipo tioéster y corresponde a un enlace químico de alta energía.

La CoA forma parte, con otras coenzimas, de los sistemas de descarboxilación oxidativa de α-cetoácidos (deshidrogenasas de piruvato, α-cetoglutarato y α-cetoácidos de cadena ramificada).

En el metabolismo de los lípidos, la CoA interviene en β-oxidación, síntesis de ácidos grasos, de colesterol y de cuerpos cetónicos.

La acetil CoA es requerida en reacciones de acetilación. La transferencia de acilos de cadena larga desde CoA a carnitina es el mecanismo por el cual los ácidos grasos ingresan en la mitocondria para ser β-oxidados.

La CoA ligada a restos miristoílo, palmitoílo o poli-isoprenilos, transfiere esas largas cadenas hidrofóbicas que sirven de anclaje de proteínas en las membranas celulares.

Requerimientos. (Tabla 27-1). La dieta normal promedio aporta sobradamente las cantidades necesarias.

No se han observado efectos tóxicos.

Avitaminosis. La falta de ácido pantoténico ha sido producida experimentalmente en diversas especies. En individuos jóvenes el signo más temprano es el retardo del crecimiento. En ratas, cerdos y pollos son comunes los trastornos gastrointestinales (gastritis y enteritis), alteraciones de la piel (hiperqueratosis, descamación, dermatitis, despigmentación, encanecimiento y caída del pelo o plumas), anemia y compromiso de las glándulas suprarrenales. Si la carencia se prolonga se llega a "agotamiento" de la glándula. Hay también trastornos en los sistemas nervioso, reproductor e inmune.

Gracias a su amplia distribución en los alimentos, la deficiencia es rarísima en humanos. Se manifiesta por intranquilidad, cansancio, hipotensión, incoordinación motora, cefalea, insomnio, anorexia, taquicardia marcada durante el ejercicio, reflejos tendinosos hiperactivos, pérdida del tacto, sensación quemante en manos y pies, reducción de la producción de anticuerpos.

Acciones farmacológicas. Se ha afirmado que altas dosis de ácido pantoténico aumentan el rendimiento de atletas, alivian los síntomas de pacientes con artritis reumatoidea o que el uso de cosméticos con ácido pantoténico o derivados mejora el aspecto y vitalidad del cabello. Ninguno de estos resultados ha podido ser confirmado.

PIRIDOXINA

Sinonimia. Vitamina B_6 (denominación muy usada), piridoxol, adermina.

Química. La *piridoxina* (PN) es un derivado de piridina (2-metil-3-hidroxi-4,5-dihidroximetilpiridina). Por oxidación genera *piridoxal* (PL), con una función formilo (aldehído) en la posición 4; por adición de un grupo amina da *piridoxamina* (PM), con una función metilamina en el carbono 4 (fig. 27-28).

En los alimentos, los tres productos están presentes en proporciones variables. En el organismo, la piridoxina (PN) es fácilmente convertida en PL y PM. Son resistentes al calor y sensibles a la luz; en medio alcalino el piridoxal se oxida a ácido 4'-piridóxico, compuesto metabólicamente inactivo.

En los productos naturales se encuentran los ésteres fosfóricos, piridoxinafosfato (PNP), piridoxalfosfato (PLP) y piridoxaminafosfato (PMP) (fig. 27-29). La esterificación con fosfato se produce en el hidroximetilo de la posición 5. En los vegetales es común la presencia del glucósido 5'-o-β-D-glucosil piridoxina.

Fuentes naturales. Libre o fosforilada, la vitamina B_6 está ampliamente distribuida en los alimentos. En los vegetales se encuentra como β-glucósido de piridoxina (PNG) y piridoxinafosfato (PNP). Cereales enteros, repollo, legumbres, hortalizas en general y nueces son buenas fuentes. Al igual que la tiamina, la vitamina B_6 de los cereales se pierde cuando se separa el sal-

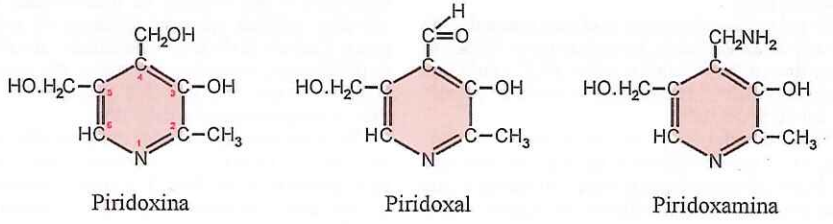


Fig. 27-28. Vitámeros de vitamina B_6.

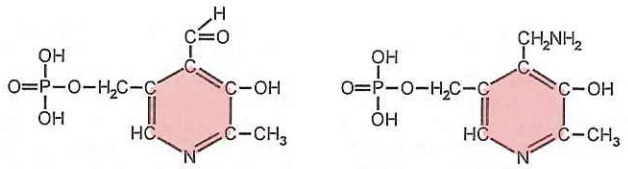


Fig. 27-29. Piridoxal fosfato y piridoxamina fosfato.

vado. Los alimentos de origen animal, como hígado, carne de cerdo y, en menor proporción, leche, carne de pescado y yema de huevo, contienen piridoxalfosfato (PLP) y piridoxal (PL), a veces unidos a proteínas; también se encuentra algo de PM y PMP.

Debido al bajo aprovechamiento de la vitamina unida como β-glucósido, la biodisponibilidad de la piridoxina es menor en las fuentes de origen vegetal que en las de origen animal.

Absorción intestinal. En intestino delgado, las formas fosforiladas de la vitamina son hidrolizadas por *fosfatasa alcalina*. La hidrólisis del glucósido de piridoxina (PNG) es catalizada por β-glucosidasas de la mucosa. PL, PM y PN ingresan a través de la mucosa intestinal, principalmente del yeyuno. Dentro de los enterocitos, los tres vitámeros son nuevamente fosforilados por una *piridoxal quinasa* y quedan "atrapados" en el interior de la célula.

Transporte. La mayor parte de los vitámeros absorbidos son liberados a la circulación portal después de desfosforilación. En el plasma, PL, PM y PN se asocian a albúmina. Los eritrocitos los captan y almacenan como PLP en unión con hemoglobina.

Metabolismo. Para su ingreso en los tejidos el PLP es disociado de la albúmina y desfosforilado. Los vitámeros libres ingresan por difusión simple. En los tejidos, principalmente en hígado, son transformados en los fosfatos correspondientes (PLP, PMP y PNP). Los fosfatos de piridoxina y de piridoxamina son oxidados a piridoxalfosfato por la *piridoxina 5'- fosfato oxidasa*, flavoproteína con FMN.

El organismo humano contiene alrededor de 250 mg de la vitamina, la mayor parte (80%) se encuentra en los músculos como PLP ligado a la glucógeno fosforilasa. El hígado contiene alrededor del 10% del total.

Papel funcional. La forma activa de la vitamina es el piridoxalfosfato (PLP), con diversas funciones. Es coenzima de unas 140 enzimas que participan en el metabolismo de aminoácidos, lípidos y fragmentos de un carbono, en vías de gluconeogénesis, de síntesis del hemo, de biosíntesis de neurotransmisores, en la glucogenólisis. El PLP puede servir de modulador de la transcripción génica.

Las reacciones del metabolismo de aminoácidos en las que intervienen enzimas dependientes de PLP obedecen al mismo principio general: el carbonilo del grupo 4-formilo forma una base de Schiff (fig. 16-3) con el grupo α-amina de aminoácidos y debilita todos los enlaces del carbono α del sustrato. Se posibilitan así reacciones de transaminación, descarboxilación, desaminación, interconversión de aminoácidos, etc.

El PLP participa también en la vía de síntesis de hemo, en la glucogenólisis (sería esencial en el mantenimiento de la estructura de la *glucógeno fosforilasa*), biosíntesis de ácidos nucleicos, en la síntesis del precursor de esfingolípidos, síntesis de carnitina y taurina, etc.

El piridoxalfosfato es capaz de reaccionar con el receptor de esteroides en el núcleo de las células y modificar su capacidad de unión al ADN. Estas acciones pueden modular la expresión de genes que responden a hormonas esteroides.

La vitamina B_6 influye sobre la diferenciación y producción de linfocitos T auxiliares (*"helper"*) y refuerza su inmunocompetencia.

Requerimientos. (Tabla 27-1). Las necesidades de piridoxina guardan relación con la ingesta de proteínas; se considera adecuado proveer 1 μg por cada gramo de proteína. Una dieta balanceada asegura cantidades adecuadas de la vitamina.

Avitaminosis. En casos de alimentación muy deficitaria o por factores no directamente nutricionales, pueden aparecer síntomas de avitaminosis. Cuando la dieta es inadecuada, no sólo falta piridoxina, sino otras vitaminas del complejo B, de modo que resulta difícil deslindar los síntomas correspondientes a cada una.

Se describen alteraciones cutáneas (dermatitis seborreica), trastornos gastrointestinales, depresión nerviosa y confusión mental, disminución de linfocitos circulantes y, a veces, anemia microcítica hipocrómica (disminución del tamaño y

de la concentración de hemoglobina de los eritrocitos). En niños, la avitaminosis produce irritabilidad, distensión abdominal, vómitos, diarrea y convulsiones epileptiformes. Estas deben estar relacionadas con el descenso del nivel de ácido γ-aminobutírico en el sistema nervioso central.

La falta de vitamina B_6 es causa de alteraciones en el sistema inmunitario. Hay disminución de la producción de linfocitos y de anticuerpos.

En individuos avitaminósicos se elimina ácido xanturénico por orina. Suele observarse también aumento de homocisteína en plasma.

Los ancianos están en riesgo de padecer hipovitaminosis; con la edad disminuye la capacidad de absorción en intestino y aumenta la oxidación de PL a ácido piridóxico inactivo.

En alcoholistas crónicos está afectada la conversión de piridoxina y piridoxamina en piridoxal fosfato.

Pacientes tratados con la droga antituberculosa hidrazida del ácido isonicotínico (isoniacida) pueden presentar cuadros de deficiencia (neuritis periférica y convulsiones).

BIOTINA

Sinonimia. Vitamina H (del alemán *Haut*: piel), se la llamó vitamina B_7, designación muy poco usada.

Química. Cristaliza en largas agujas, es poco soluble en agua y etanol, insoluble en éter y cloroformo, estable al calentamiento. En virtud de su carácter ácido forma sales muy solubles en agua.

Está constituida por dos ciclos heterocíclicos condensados, tetrahidrotiofeno fusionado a un resto ureido (urea), que contribuye a conformar un ciclo imidazolidona. El carbono en la posición 2 del núcleo tiofeno posee una cadena lateral ácido pentanoico o valérico (fig. 27-30).

En los productos naturales la mayor parte está unida a apoenzimas por enlace tipo amídico. La acción de proteasas deja en libertad ε-N-biotinil-L-lisina, compuesto hidrosoluble llamado *biocitina*.

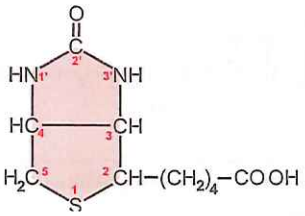


Fig. 27-30. Biotina.

Fuentes naturales. La biotina está ampliamente distribuida en los alimentos. En los vegetales hay mayor proporción de biotina libre. Hígado, riñón, leche, yema de huevo, tomate y otras hortalizas, harina de soja, cereales, maní y levadura de cerveza son excelentes fuentes. En la leche humana casi toda la biotina está libre.

La biotina es sintetizada por la flora microbiana del intestino humano; se desconoce la cantidad absorbida.

Absorción intestinal. La relación de biotina libre sobre la fijada a proteínas varía mucho en distintos alimentos. Las proteasas hidrolizan las uniones peptídicas de esas proteínas pero no el enlace de la biotina con el grupo ε-amina de restos lisina o de algunas uniones entre aminoácidos próximos, de modo que se liberan biocitina y peptidil-biotinilo. Una *biotinidasa* presente en jugo pancreático y membrana del borde en cepillo libera la biotina de la biocitina.

En la clara de huevo existe una glicoproteína, llamada *avidina*, que se fija a la biotina formando un complejo resistente a las proteasas pancreáticas e impide la absorción de la vitamina. La avidina se inactiva por calentamiento, razón por la cual el consumo de huevos cocidos no compromete el ingreso de biotina.

Transporte. En el plasma, poco más del 80% de la biotina se encuentra libre y la mayor parte del resto es vehiculizada por albúmina. La biocitina existente en la sangre es escindida por biotinidasa en biotina y lisina. La biotina queda ligada a la biotinidasa, que se convierte así en transportadora de la vitamina.

Metabolismo. El hígado, los linfocitos y otros tejidos (riñón y sistema nervioso central) captan biotina de la sangre. En riñón, la biotina filtrada se reabsorbe en los túbulos.

La biotina se une a apoenzimas para formar holocarboxilasas. Cuando éstas cumplen su ciclo vital, son hidrolizadas y dejan peptidilbiotinilo y biocitina libres, de los cuales la *biotinidasa* libera biotina, empleada en la síntesis de nuevas holocarboxilasas. Hay un activo reciclado de la vitamina. La biotinidasa actúa como transportadora de biotina en sangre y en reacciones de transferencia de biotina a moléculas aceptoras.

Papel funcional. En mamíferos, la biotina funciona como coenzima de cinco carboxilasas. A diferencia de las carboxilaciones dependientes de vitamina K, en las cuales se fija CO_2, las dependientes de biotina utilizan bicarbonato (HCO_3^-). La porción biotina sirve de aceptora y transportadora de HCO_3^- (fig. 27-31).

La unión de biotina a las apoenzimas es catalizada por *holocarboxilasa sintetasa*. La enzima

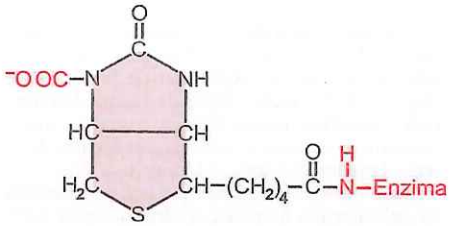


Fig. 27-31. Complejo CO_2-Biotina-Apoenzima ("CO_2 activado").

es responsable de la formación de las cinco carboxilasas dependientes de biotina existentes en humanos. Estas son *acetil-CoA* (α y β), *piruvato*, *propionil-CoA* y *β-metilcrotonil-CoA carboxilasas*. Catalizan la fijación de bicarbonato a ácidos orgánicos. La acetil-CoA α-carboxilasa es citosólica, las otras se localizan en mitocondrias.

Transferencia de biotina a histonas. Reacciones de biotinilación y desbiotinilación catalizadas por *holocarboxilasa sintetasa* y *biotinidasa* influyen en el empaquetamiento de la cromatina y con ello en los procesos de transcripción y replicación del ADN.

Regulación de la expresión génica. Recientemente se ha demostrado la participación de la biotina en otros procesos, no ya como coenzima, sino como moduladora de la expresión génica. El biotinil-AMP modula la transcripción y traducción de ARNm de genes que codifican enzimas "clave" en el metabolismo intermedio. Además, afecta la expresión de genes que codifican citoquinas y sus receptores.

Multiplicación celular. La biotina sería un factor necesario para el cumplimiento del ciclo celular.

Acciones sobre el sistema inmunitario. En animales de laboratorio, la biotina es necesaria para el funcionamiento normal de distintas células del sistema inmune (macrófagos, linfocitos T y B y respuesta de células T citotóxicas). Participa en la regulación de la síntesis de inmunoglobulinas A (IgA).

Requerimientos. (Tabla 27-1). No se conocen con certeza. No se han registrado efectos tóxicos.

Avitaminosis. Gracias a la amplia distribución de biotina en los alimentos y a la síntesis por bacterias intestinales, es rarísima la incidencia de avitaminosis en clínica. Se han observado casos excepcionales en humanos. La avitaminosis produce alteraciones dérmicas, anemia, anorexia, náuseas, hipotonía, laxitud y dolores musculares, parestesia, ataxia, alucinaciones. En lactantes y niños se retarda el crecimiento. Se observan también alteraciones en el sistema inmunitario, tanto celular como humoral. Pueden aparecer acidosis láctica y aciduria orgánica. La avitaminosis de biotina durante la gestación es teratogénica. En las deficiencias severas hay alteraciones metabólicas debidas a reducción de actividad de las carboxilasas. Están afectadas la biotinilación de histonas y la regulación génica dependiente de la vitamina.

Aparte de las deficiencias nutritivas, se han descripto varios cuadros de origen genético debidos a fallas en la síntesis de *holocarboxilasa sintetasa* y de cada una de las carboxilasas.

Deficiencia de biotinidasa. En esta condición no puede liberarse la biotina de la biocitina de los alimentos; están bloqueadas la recuperación de la vitamina de la biocitina y de los peptidil-biotinilos y la biotinilación de proteínas.

ÁCIDO FÓLICO

Sinonimia. Ácido pteroilglutámico, folacín, raramente se emplea la designación vitamina B_9.

Química. Es ligeramente soluble en agua, estable al calor. El nombre se debe a su presencia en hojas vegetales. Está constituido por tres componentes: un núcleo bicíclico pteridina, ácidos paraaminobenzoico (PABA) y glutámico. Desde el carbono 6 del núcleo 2-amino-4-hidroxipteridina se extiende un puente metileno (C 9) al grupo amina (N 10) del ácido p-aminobenzoico para formar *ácido pteroico*; éste se une a ácido glutámico mediante enlace de tipo peptídico (fig. 27-32).

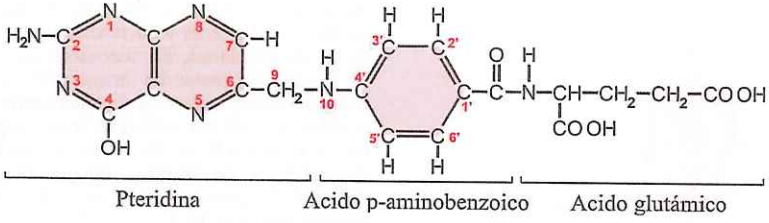


Fig. 27-32. Ácido fólico.

En la naturaleza existen pteroilpoliglutamatos, derivados del ácido fólico por adición sucesiva de residuos glutamilos mediante uniones γ-peptídicas. Se los denomina *folatos*; el nombre ácido fólico es reservado para el monoglutamato. En vegetales se encuentran heptaglutamatos; en hígado de mamíferos el más abundante es el pentaglutamato.

Por reducción, el ácido fólico da, 7,8-dihidrofólico (DHF) y 5,6,7,8-tetrahidrofólico (THF) (fig. 27-33).

Los derivados de folatos de interés funcional son poliglutamilos de tetrahidrofolato con unidades de un carbono insertadas en las posiciones 5 o 10, o en ambas, a manera de puente. Los grupos adicionados pueden ser metilo ($-CH_3$), formilo (–CH=O), formimino (–CH=NH), metilén ($-CH_2-$) o metenilo (–CH=). El 5-formil-THF, más resistente a la oxidación, usado en preparaciones farmacéuticas, es llamado *ácido folínico*.

Fuentes naturales. Hortalizas de hoja, espárragos, legumbres, brócoli, frutilla, naranja, hongos, maní, hígado, riñón y levadura de cerveza son buenas fuentes de ácido fólico. También se encuentra la vitamina, en menor cantidad, en la carne y el trigo.

Los folatos de los productos naturales son una mezcla de poliglutamilos de folato reducido [$THF(Glu)_n$], principalmente 5-metil-THF y 10-formil-THF, unidos a proteínas y a polisacáridos de reserva.

Absorción intestinal. Los poliglutamatos deben ser convertidos en monoglutamatos (THF) para su absorción. Las proteasas del tubo digestivo no hidrolizan enlaces γ-peptídicos; es la *poliglutamato hidrolasa* o *folato conjugasa* de mucosa de yeyuno y jugo pancreático la que libera, una a una, las unidades terminales de glutamato. Se absorbe en la porción proximal de intestino delgado, principalmente en yeyuno. La flora bacteriana del colon sintetiza folatos que son parcialmente absorbidos.

Metabolismo. En el enterocito, el folato es reducido por *dihidrofolato reductasa*, dependiente de NADPH, que transfiere hidrógenos al ácido fólico y da dihidrofolato (DHF) y tetrahidrofolato (THF).

El THF es metilado en el N 5 del núcleo pteridina para formar 5-metil-THF y enviado a la circulación portal. En las células, la *folilpoliglutamato sintetasa* desmetila el 5-metil-THF y luego forma poliglutamato.

Del contenido total de un adulto (15 a 30 mg), la mitad está en el hígado, gran parte como pentaglutamato. Si no hay aporte de la vitamina, las reservas demoran 3 meses en agotarse.

El THF metilado es en parte secretado con la bilis y reabsorbido en intestino; unos 100 μg de folato son reciclados diariamente a través de la circulación enterohepática.

Papel funcional. Los pteroilglutamatos participan como coenzimas en reacciones de transferencia de restos monocarbonados que ocurren en la interconversión y catabolismo de aminoácidos, la síntesis de purinas y pirimidinas, la formación del agente metilador S-adenosilmetionina (SAM), etc.

Formación de donantes de restos monocarbonados. El $THF(Glu)_n$ acepta metilos generados en el catabolismo de serina, glicina y colina, en reacciones catalizadas por *metiltransferasas*.

Son ejemplos de vías metabólicas en las cuales participan folatos:

Conversión de pirimidinas. La *timidilato sintasa* cataliza la cesión de un metilo a desoxiuridina monofosfato (dUMP) y forma desoxitimidina monofosfato (dTMP). *Síntesis de purinas.* En la producción *de novo* de adenina y guanina interviene el 10-formil-THF producido a partir de 5,10-metilén-THF.

Todas las células que se dividen requieren folatos, pero lógicamente aquéllas que tienen mayor actividad mitótica son más dependientes de ácido fólico. Esto explica por qué uno de los signos más notables de la deficiencia de ácido fólico es la depresión de la eritropoyesis y de la formación de leucocitos y plaquetas. Las células de la mucosa intestinal y las de la progenie espermatogénica también tienen una importante tasa de multiplicación y, en consecuencia, son sensibles a la reducción del aporte de ácido fólico.

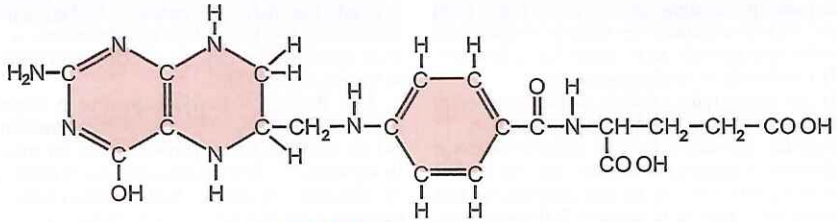


Fig. 27-33. Ácido tetrahidrofólico.

Formación de metionina. Una de las vías generadoras de metionina parte de homocisteína y requiere *metionina sintasa,* 5-metil-THF y cobalamina. El metilo del 5-metil-THF es transferido a la homocisteína.

Hay evidencias firmes de que el ácido fólico cumple un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) en las primeras semanas de gestación.

Requerimientos. (Tabla 27-1). No se ha demostrado toxicidad de dosis moderadas de folatos en tratamientos agudos o crónicos. Se ha fijado un máximo tolerable no relacionado con posibles efectos tóxicos, sino con el riesgo de enmascarar otros cuadros patológicos que cursan con anemia megaloblástica.

Avitaminosis. Se observa deficiencia en personas con una dieta muy pobre y en pacientes con trastornos en la absorción intestinal o tratados con antiinflamatorios y anticonvulsivantes.

El déficit de folatos suele presentarse en personas de edad avanzada y en alcoholistas crónicos. El alcohol interfiere la absorción de folato, la captación por el hígado y la reabsorción en túbulos renales.

La avitaminosis provoca anemia megaloblástica caracterizada por la presencia en la circulación de eritrocitos inmaduros de tamaño mayor que los normales y reducción del número de leucocitos y plaquetas.

La anemia produce sensación de debilidad y fatiga al más mínimo esfuerzo, palidez, cefalea, irritabilidad.

Hay alteraciones en el epitelio de la lengua y mucosa bucal, con ulceraciones superficiales. Las carencias graves producen depresión de la espermatogénesis y trastornos intestinales por alteración de la mucosa. También se produce hiperhomocisteinemia, factor de riesgo de enfermedad cardiovascular.

Las embarazadas tienen posibilidades de padecer hipovitaminosis, ya que la demanda de folatos aumenta durante el desarrollo del embrión. El sistema nervioso es particularmente sensible; la carencia de ácido fólico en las primeras semanas de gestación puede producir anomalías, especialmente en el cierre del tubo neural. Varios estudios han demostrado que suplementos de ácido fólico (400 μg por día) inmediatamente antes y al comienzo del embarazo (período periconcepcional) disminuyen la incidencia de malformaciones.

Se ha encontrado relación consistente entre incidencia de cáncer y deficiencia de folatos.

Defectos genéticos. Se han descrito defectos hereditarios en genes relacionados con el metabolismo de folatos. Uno de los más comunes es una mutación en el gen de la *metilén-THF-reductasa,* que resulta en la síntesis de una enzima más lábil y menos activa que la normal. Las mujeres homocigotas presentan riesgo de tener hijos con alteraciones de desarrollo del sistema nervioso central, principalmente defectos en el cierre del tubo neural (espina bífida). El riesgo se incrementa si la alimentación es deficitaria en ácido fólico y disminuye si se administran altas dosis de la vitamina unos meses antes y después de la concepción.

Antivitaminas. Existen compuestos estructuralmente análogos del ácido fólico que actúan como potentes antagonistas metabólicos o antivitaminas. Uno de ellos es el *metotrexato* (ametopterina o ácido 4-amino-10-metilfólico); se une al sitio activo de la dihidrofolato reductasa y la inhibe. Disminuye la concentración intracelular de folatos y se acumulan DHF y 10-formil-THF, de acción citotóxica. La *aminopterina* (ácido 4-aminofólico) y el *5-fluorouracilo* son también antifólicos.

Todos los fármacos mencionados bloquean la síntesis de ADN y reducen la proliferación celular. En virtud de esta capacidad, son utilizados en el tratamiento de tumores malignos. Estas drogas afectan también a células normales, especialmente hematopoyéticas; es necesario un control riguroso de los pacientes.

COBALAMINA

Sinonimia. Vitamina B_{12}, factor antianemia perniciosa, factor extrínseco.

Química. La cobalamina, de color rojo intenso, contiene cobalto y fósforo; es el único compuesto orgánico de productos naturales que posee Co. Una porción de la molécula tiene analogía con el núcleo porfina; está formada por el anillo tetrapirrólico *corrina,* en cuyo centro se encuentra un átomo de cobalto, a semejanza del Fe^{2+} en el hemo. El cobalto tiene seis sitios de coordinación; cuatro de ellos ocupados por los nitrógenos de los pirroles. Un quinto lo asocia a un "nucleótido" formado por 5,6-dimetilbenzimidazol, ribosa, fosfato y un grupo aminopropanol, que también se fija a una de las cadenas laterales de la corrina. El sexto sitio de coordinación puede ser ocupado por distintos ligandos: –OH en la hidroxicobalamina, H_2O en la acuocobalamina, o –CN en la cianocobalamina (fig. 27-34); esta última es la forma más estable.

Los derivados *metilcobalamina* y *coenzima B_{12}* o *5'-desoxiadenosilcobalamina* cumplen papel de coenzimas. La primera tiene un metilo y la segunda, 5'-desoxiadenosina en el sexto sitio de coordinación del Co. Ambas están unidas a las enzimas a las que sirven como cofactores.

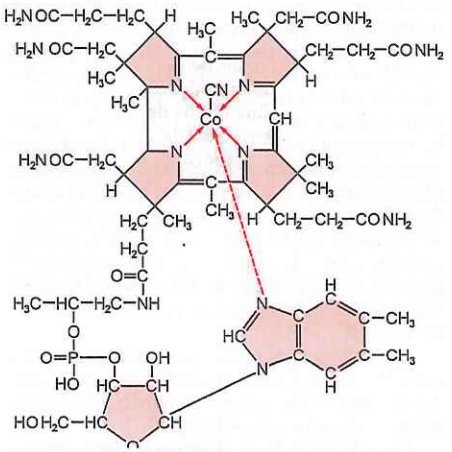


Fig. 27-34. Cianocobalamina.

Fuentes naturales. Alimentos de origen animal son la única fuente importante de vitamina B_{12}. El hígado es muy rico; también se encuentra en riñón, corazón, carnes, mariscos, leche, manteca, queso, yema de huevo. No existe en alimentos vegetales, excepto en preparaciones fermentadas, contaminadas con bacterias.

El ser humano depende de la vitamina B_{12} aportada por la dieta. Aunque las bacterias de la flora de intestino grueso sintetizan cobalamina, es muy poco lo que se absorbe.

La vitamina B_{12} es atóxica; no se han establecido límites máximos tolerables.

Absorción intestinal. A mayor oferta de cobalamina, menor es la proporción absorbida. En los alimentos la vitamina está unida a proteínas. El medio ácido y la pepsina del estómago favorecen la liberación de metilcobalamina y adenosilcobalamina y su unión a *haptocorrina*, proteína secretada por las glándulas salivales y otras glándulas exocrinas. En el duodeno la haptocorrina es hidrolizada por proteasas pancreáticas y libera la cobalamina, que se une muy selectivamente a *factor intrínseco* (FI), glicoproteína de 45 kDa con 20% de carbohidratos, producida por las células parietales de mucosa, las mismas que segregan HCl. A la vitamina B_{12} se la llamaba "factor extrínseco". El complejo formado por factor intrínseco y vitamina B_{12} es resistente a la hidrólisis por proteasas. Cuando el complejo llega a la porción terminal del íleon, encuentra receptores específicos en la mucosa, que reconocen selectivamente al factor intrínseco. El complejo cobalamina-FI-receptor ingresa por endocitosis; dentro del enterocito se libera la cobalamina.

En la vecindad de la membrana basolateral la cobalamina se une a *transcobalamina*, una β-globulina de alrededor de 43 kDa, y pasa a la circulación portal.

Metabolismo. El complejo transcobalamina-vitamina B_{12} es captado en membrana plasmática de todas las células por receptores específicos, introducido en ellas por pinocitosis e incorporado a lisosomas, en los que se libera la cobalamina. Hígado y riñón son los órganos más ricos en receptores. En todo el organismo hay depositados de 3 a 5 mg de cobalamina, 80% de los cuales están en hígado. La reserva es importante, razón por la cual la aparición de síntomas de carencia después de dietas sin vitamina demora años en aparecer. El organismo cuida celosamente la cobalamina que posee.

En hígado y otros tejidos, la vitamina B_{12} es convertida en los dos compuestos que actúan como coenzimas: *metilcobalamina*, generada en el citoplasma por transferencia de metilo desde 5-metil-tetrahidrofolato, y la llamada *coenzima B_{12}* o *5'-desoxiadenosilcobalamina*, formada en mitocondrias por una reacción en la cual el ATP cede su porción adenosina. Ambas formas son almacenadas en unión con su apoenzima. La vitamina B_{12} no es degradada en el organismo; la que excede la capacidad de unión de las proteínas de transporte en el plasma es excretada intacta por orina.

Papel funcional. En mamíferos existen dos enzimas dependientes de vitamina B_{12}, la *metionina sintasa*, que requiere metil-cobalamina, y la *metilmalonil-CoA mutasa*, que utiliza 5'-desoxiadenosil cobalamina.

Conversión de homocisteína en metionina. Un derivado de metionina, la S-adenosilmetionina (SAM), es donante de metilo en numerosas síntesis y en la metilación de ADN, ARN y proteínas, transformándose en S-adenosilhomocisteína, luego hidrolizada a homocisteína y adenosina. La homocisteína se remetila para dar nuevamente metionina en reacción catalizada por *metionina sintasa*, dependiente de metilcobalamina. Participan como coenzimas metilcobalamina y 5-metil-THF (fig. 27-35).

La transmetilación a cobalamina es la vía principal de regeneración de THF, que puede formar 5,10-metilén-THF. Cuando falta vitamina B_{12} disminuyen la síntesis de metionina y la formación de THF; se acumulan homocisteína y 5-metil-THF. Este último no es utilizable para otros fines ("trampa de 5-metil-THF") y se pierde por orina.

Isomerización de L-metilmalonil-CoA a succinil-CoA. Durante el catabolismo de metionina, treonina, valina e isoleucina y la β-oxidación de

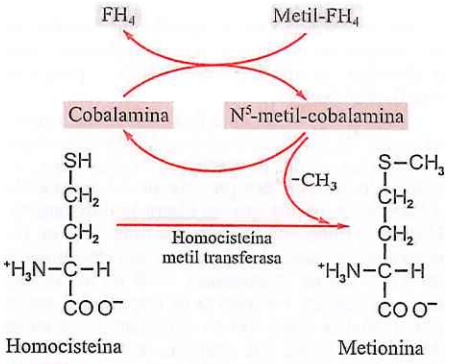


Fig. 27-35. Conversión de homocisteína en metionina.

ácidos grasos de cadena impar, se produce propionil-CoA, el cual es carboxilado a metilmalonil-CoA. El L-metilmalonil-CoA se transforma, por acción de la *L-metilmalonil-CoA mutasa*, en succinil-CoA, intermediario del ciclo del ácido cítrico (fig. 27-36). La L-metilmalonil-CoA mutasa utiliza como coenzima 5'-desoxiadenosil cobalamina.

Requerimientos. (Tabla 27-1). No se han registrado efectos tóxicos por administración de dosis elevadas de vitamina B_{12}.

Avitaminosis. Produce un cuadro de anemia megaloblástica similar al descripto en la falta de ácido fólico. La relación funcional entre vitamina B_{12} y folatos explica por qué la deficiencia de cualquiera de ellas da lugar al mismo tipo de anemia. La anemia es debida a la falta de folato subsiguiente a la carencia de cobalamina. En sangre hay pancitopenia, glóbulos rojos inmaduros y granulocitos hipersegmentados. En la médula ósea se acumulan células inmaduras, muchas de las cuales mueren, probablemente por apoptosis.

La avitaminosis B_{12} se diferencia de la de folatos por la mayor severidad de las alteraciones neurológicas y psiquiátricas. Hay desmielinización en nervios periféricos, luego en las columnas posteriores y laterales de médula espinal y

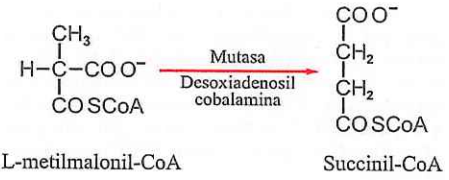


Fig. 27-36. Isomerización de L-metilmalonil-CoA a succinil-CoA.

en el sistema nervioso central. Los síntomas comienzan en los pies y van ascendiendo a piernas y manos. Hay sensación de debilidad y parestesia dolorosa en las extremidades, ataxia, pérdida de la coordinación fina de los dedos de la mano, espasticidad y trastornos en la marcha. Cuando la desmielinización alcanza a los hemisferios cerebrales aparecen síntomas neuropsiquiátricos (disminución de la memoria, irritabilidad, apatía, depresión, psicosis y demencia; ocasionalmente se producen delirios). Si no es tratada, la avitaminosis lleva a la muerte. La administración de la vitamina cuando ya se han producido daños irreversibles sólo detiene su progresión, pero no los mejora.

Los lactantes de madres con carencia de vitamina B_{12} pueden sufrir irritabilidad, alteraciones del desarrollo del sistema nervioso y del crecimiento y anemia megaloblástica.

En la deficiencia de vitamina B_{12} hay aumento de las concentraciones de ácido metilmalónico, homocisteína y cistationina en plasma y orina.

La deficiencia dietaria por falta de alimentos de origen animal, generalmente menos accesibles para las clases humildes, es un problema cuya incidencia va en aumento en varias regiones del mundo. Es común también en vegetarianos estrictos.

Los cuadros más serios de avitaminosis observados en clínica humana se deben a malabsorción debida a diversas causas, las más importantes relacionadas con el factor intrínseco (FI). La falta de FI produce la llamada *anemia perniciosa*, que presenta toda la sintomatología arriba descripta.

La *anemia perniciosa* es una enfermedad autoinmune; en los pacientes se han demostrado autoanticuerpos. En su mayoría, los síntomas se expresan en sujetos mayores de 50 años. Se trata con vitamina B_{12} administrada por vía parenteral, pues por vía oral no sería absorbida. La cobalamina es un agente terapéutico de extraordinaria potencia. Con sólo 1 mg por semana durante 4 a 8 semanas se obtienen respuestas favorables y luego se continúa con una inyección por mes, lo que mantiene una eritropoyesis satisfactoria.

El tratamiento con ácido fólico mejora la anemia, pero no tiene acción sobre las alteraciones neurológicas.

Los pacientes sometidos a gastrectomía total pierden las células que secretan FI; las resecciones quirúrgicas de más de 50 cm del íleon disminuyen la capacidad de absorción; la hipoclorhidria que acompaña a la gastritis atrófica y el uso prolongado de bloqueantes de receptores de histamina e inhibidores de la bomba de protones utilizados en el tratamiento de úlceras pépticas e hiperclorhidria reducen la captación de vitamina

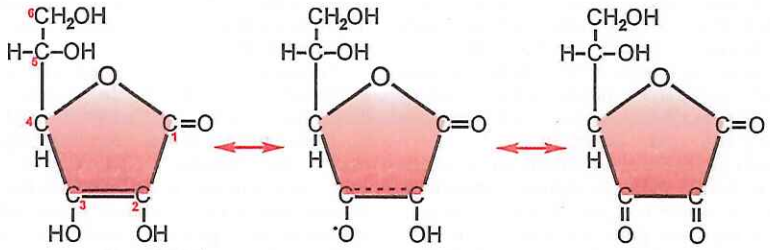


Fig. 27-37. Ácido ascórbico – radical ascorbilo – ácido deshidroascórbico.

B_{12}. En personas de edad avanzada es común la deficiencia por malabsorción.

Trastornos genéticos. Diversas fallas genéticas que afectan la síntesis de proteínas involucradas en la absorción y transporte de cobalamina causan deficiencia. Entre ellas se cuentan las mutaciones en el gen del factor intrínseco, que determinan falta total del FI o producción de una proteína no funcionante. Se manifiesta en niños de 1 a 3 años, cuando la reserva de vitamina B_{12} transmitida por la madre se ha agotado.

Acciones farmacológicas. Se ha propuesto el uso de vitamina B_{12} a altas dosis para tratamiento de neuralgias y neuritis o mejoramiento del estado general. No hay pruebas que justifiquen esas aplicaciones de la cobalamina.

ÁCIDO ASCÓRBICO

Sinonimia. Vitamina C, ascorbato, factor antiescorbuto.

Química. La vitamina C es una sustancia cristalina, blanca, muy soluble en agua e insoluble en lípidos y solventes orgánicos. Es una α-cetolactona de seis carbonos cuya estructura recuerda a la de las hexosas. Adopta configuración furanósica (heterociclo de 5 miembros). A diferencia de la gran mayoría de los glúcidos metabolizables de nuestro organismo, que pertenecen a la serie D, el ácido ascórbico activo es el isómero L (fig. 23-37). Su carácter ácido se debe a la ionización del hidroxilo del carbono 3. A pH fisiológico, la molécula existe como anión monovalente (ascorbato). Es un enérgico reductor; cede dos de sus hidrógenos con gran facilidad; primero se pierde un electrón y se forma el *radical ascorbilo*, relativamente estable, y luego *ácido deshidroascórbico* (ADA) (fig. 27-37).

Acción antioxidante. La interconversión ácido ascórbico–ácido deshidroascórbico ocurre fácilmente, lo que facilita su participación en reacciones redox. En medios biológicos, la concentración de ácido ascórbico es mayor que la de deshidroascórbico y la de éste, mayor que la de radical ascorbilo.

Cuando el ácido L-deshidroascórbico es hidratado, se convierte en ácido 2,3-dicetogulónico (fig. 27-38), sin actividad. En soluciones neutras o alcalinas, esta hidratación tiene lugar espontáneamente.

Fuentes naturales. El ácido ascórbico se encuentra principalmente en alimentos vegetales

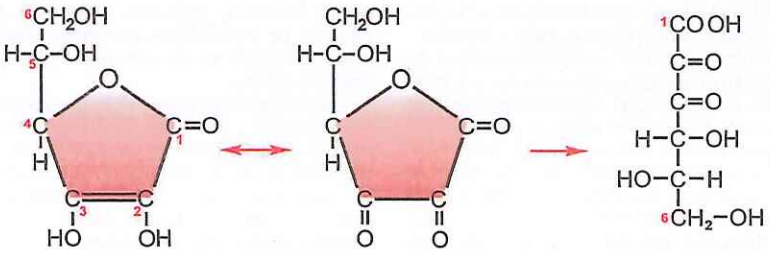


Fig. 27-38. Formación de ácido 2,3-dicetogulónico.

frescos. Frutos cítricos (limón, naranja, pomelo), frutilla, kiwi, melón y tomate son excelentes fuentes. Espinaca, brócoli, repollo, coliflor, pimiento, papa, espárrago, arvejas, habas, poseen vitamina C, pero parte se pierde durante el proceso de transporte, almacenamiento a temperatura ambiente y, sobre todo, de cocción.

El ácido ascórbico es inactivado en vegetales desecados. En los jugos de cítricos y tomate en contacto con el aire hay pérdida lenta y progresiva de la vitamina. Entre los alimentos de origen animal, el hígado es el más rico, el riñón y el corazón también tienen ácido ascórbico, no así la carne. La escasa cantidad presente en la leche de vaca desaparece durante la pasteurización. El congelamiento de los alimentos no afecta su contenido de vitamina C. La leche materna provee al lactante suficiente cantidad de ácido ascórbico.

Absorción intestinal. En los alimentos, 85% de la vitamina C se encuentra en su forma reducida (AA) y el resto como ácido deshidroascórbico (ADA). Parte del AA en la luz intestinal se oxida para mantener en estado reducido a algunos componentes de la dieta, como el hierro por ejemplo.

Las dos formas de la vitamina ingresan a través de la mucosa, principalmente en el íleon. Si se ingieren dosis altas el porcentaje absorbido disminuye. Dentro del enterocito el ADA es reducido a AA. En el plasma, el ácido ascórbico se encuentra libre y se distribuye a todas las células.

Metabolismo. En las células, el ADA es convertido en ascorbato por la *deshidroascórbico reductasa*, enzima que requiere glutatión como aceptor/donante de hidrógeno.

El contenido de vitamina C en los tejidos es más elevado que el de otras vitaminas hidrosolubles. En efecto, en individuos normales existe una reserva de unos 1.500 mg, que permite tolerar una dieta carenciada durante dos meses o más sin denotar síntomas francos de deficiencia. La concentración de ácido ascórbico es elevada en algunas glándulas del sistema endocrino (corteza y médula adrenal e hipófisis) y leucocitos; es importante en hígado, riñón, páncreas, bazo y cerebro.

Los ácidos ascórbico y deshidroascórbico del plasma filtran en los glomérulos renales y son reabsorbidos en los túbulos colectores proximales. Alrededor del 25% es convertido en oxalato y excretado por orina; el resto es oxidado hasta CO_2. Cuando se administran dosis elevadas (más de 500 mg) se elimina por orina casi el 100% de la dosis ingerida. La excreción de oxalato no varía significativamente aun con consumos superiores a los 5 g.

Papel funcional. Probablemente todas las funciones del ácido ascórbico están relacionadas con su capacidad reductora o antioxidante. En mamíferos actúa como cofactor de al menos ocho oxidorreductasas.

Formación de colágeno. La vitamina C es indispensable para mantener la estructura normal de las fibras colágenas. La proteína del colágeno contiene restos 4-hidroxiprolina, importantes para la conformación y estabilidad de la molécula e hidroxilisina, responsable de los puentes intercatenarios que mantienen la triple hélice. La hidroxilación de prolinas y lisinas en el colágeno requiere ácido ascórbico.

Síntesis de carnitina. Participan dos dioxigenasas que dependen de ácido ascórbico; son metaloenzimas con hierro; el ascorbato mantiene el hierro al estado ferroso.

Síntesis y catabolismo de tirosina. En estas vías hay reacciones que requieren vitamina C (pág. 344).

Síntesis de neurotransmisores y hormonas. La vitamina C participa en la síntesis de *catecolaminas* y *serotonina*. También en la amidación postraducción del C-terminal de algunas hormonas.

Acción antioxidante. El ascorbato no sólo actúa como cofactor en diversas reacciones, sino que ejerce una importante función, no enzimática, como agente reductor en medios acuosos como la sangre y los espacios intra- y extracelulares. Está comprometido en acciones de protección contra las *especies reactivas de oxígeno* y *nitrógeno* (ver Cap. 10).

Absorción de hierro. Gran parte del hierro que llega al intestino se encuentra oxidado (Fe^{3+}, férrico) y debe ser reducido al estado ferroso (Fe^{2+}) para absorberlo. Esta acción es cumplida por ácido ascórbico.

Requerimientos. (Tabla 27-1). En procesos febriles, infecciones, diarreas, hipertiroidismo, traumatismos e intervenciones quirúrgicas, es recomendable dar 200 mg o más por día.

Avitaminosis. Entre los mamíferos, únicamente humanos, primates, cobayos y algunas especies de murciélagos presentan síntomas de carencia cuando se los somete a dietas libres de ácido ascórbico.

La población en riesgo es la que consume pocos vegetales y frutas frescas. La falta de vitamina C en la dieta produce *escorbuto*, enfermedad conocida desde la antigüedad. Era común entre los miembros de expediciones, travesías o campañas militares que durante mucho tiempo sólo consumían alimentos desecados.

Se caracteriza por fatiga y lasitud muscular, puntillado hemorrágico (petequias) o hematomas en napa en la piel de zonas de flexión o roce,

encías inflamadas que sangran con facilidad, las piezas dentarias se aflojan en sus alvéolos, hemorragias subperiósticas y en articulaciones que causan intenso dolor; síntomas todos causados por extravasación de sangre en los capilares. Hay defectos de calcificación de huesos y dientes, insuficiente absorción de hierro que lleva a anemia. En niños, las alteraciones son más notables en los sitios de crecimiento óseo más activo. Las deficiencias extremas se observan raramente; conducen a la muerte si no son tratadas oportunamente. Se presentan casos de menor gravedad, con retardo en la cicatrización de heridas, menor resistencia a infecciones y algunos de los trastornos mencionados.

Acciones farmacológicas. Se ha propuesto la ingesta de dosis enormes (megadosis) de vitamina C (1, 2 o más gramos por día) como preventivo de resfríos y otras infecciones, de complicaciones de la diabetes, del desarrollo de cataratas, o para aumentar la capacidad de cicatrización de heridas. Hasta ahora no ha sido posible obtener pruebas incuestionables que justifiquen dicha práctica.

OTROS FACTORES NUTRITIVOS

Hay un grupo de compuestos de importancia desde el punto de vista nutritivo y metabólico, ya que en algunas situaciones especiales su carencia puede ser causa de trastornos, pero no pueden ser consideradas vitaminas ya que son sintetizadas en el organismo. Algunas de esas sustancias fueron inicialmente consideradas integrantes del complejo vitamínico B, razón por la cual se las considera a continuación.

COLINA

La colina es una base de amonio cuaternario (2-hidroxietil trimetilamina) (fig. 27-39), soluble en agua y alcohol e insoluble en cloroformo y éter. Es resistente al calentamiento prolongado. Es constituyente de lípidos complejos (fosfatidilcolina y esfingomielina) en membranas celulares y de acetilcolina, intermediario químico en el sistema nervioso.

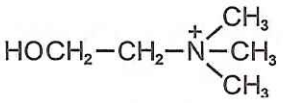


Fig. 27-39. Colina.

Fuentes naturales. Como fosfatidilcolina, está ampliamente distribuida en los alimentos. Las fuentes más ricas son hígado, yema de huevo, carnes, germen de trigo, soja, cereales, coliflor, porotos, maní.; en la soja, el 45% está como colina libre.

Absorción. La fosfatidilcolina (PC, también llamada lecitina), principal fuente de colina en la dieta común, es hidrolizada por *fosfolipasas*. La esfingomielina de los alimentos deja colina libre en intestino. La colina es una molécula con carga positiva, no atraviesa libremente las membranas; ingresa en los enterocitos por un transportador. El destino principal de la colina en los tejidos es la síntesis de PC (pág. 317).

Funciones. La colina es un importante contribuyente a la estructura y propiedades de las membranas celulares. PC es el fosfolípido más abundante en membranas, localizada preferentemente en la capa lipídica externa. La esfingomielina también se encuentra, en menor proporción, en todas las membranas.

Transmisión del impulso nervioso. La acetilcolina es esencial para la función de las neuronas colinérgicas, en las que se sintetiza por acción de la *colina acetilasa* y se acumula en vesículas sinápticas. La despolarización de la membrana libera la acetilcolina, que se une a receptores en la neurona postsináptica. En el espacio intersticial de la sinapsis es rápidamente hidrolizada por *acetilcolina esterasa*.

Regulación osmótica. El volumen celular depende de la concentración de osmolitos. Colina, y sus derivados betaína y glicerofosfocolina son osmolitos orgánicos.

Metabolismo de restos monocarbonados. La colina es dadora de metilos, relacionada con la formación de metionina, que a su vez genera S-adenosilmetionina (SAM), principal agente de metilaciones.

Otras. El *factor activante de plaquetas* (PAF) es un fosfolípido con colina (1-O-alquil-2-acetilglicerilfosforilcolina). Un importante componente del factor surfactante (reductor de tensión superficial) en pulmón es la *dipalmitoil fosfatidilcolina*.

Requerimientos. Son fácilmente provistas por una dieta mixta normal; los suplementos no tienen justificación. En personas sanas, no se han detectado efectos tóxicos con dosis elevadas.

Deficiencia de colina. Ha sido estudiada en animales de laboratorio. La administración de una dieta carente de colina por tiempo prolongado afecta el crecimiento y el desarrollo, hay trastornos hepáticos, renales y pancreáticos. Se produce hígado graso, probablemente por reducción

de la síntesis de fosfolípidos indispensables para la incorporación de triacilgliceroles a las lipoproteínas VLDL. La administración de colina a estos animales moviliza los depósitos anormales de grasas, efecto designado *acción lipotrópica*. En riñón hay alteraciones de la capacidad para concentrar la orina, se produce necrosis tubular y hemorragia intersticial como resultado de la falta de los osmolitos colina y betaína.

En humanos no es común observar cuadros de carencia.

TAURINA

La taurina (ácido 2-aminoetilsulfónico) (fig. 27-40) es un aminoácido que se encuentra libre en la mayoría de tejidos de mamíferos, especialmente músculo esquelético, corazón y sistema nervioso.

Es generada en el catabolismo de cisteína, la que a su vez se forma durante la degradación de metionina. Un adulto normal sintetiza de 200 a 400 μmoles de taurina por día.

Se encuentra en alimentos de origen animal; los vegetarianos estrictos reciben muy poca taurina.

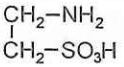


Fig. 27-40. Taurina.

Funciones. Durante mucho tiempo se consideró a la taurina un simple producto final del catabolismo de aminoácidos azufrados, pero más recientemente se le han reconocido diversas funciones. La mejor conocida es la de unirse a compuestos poco hidrofílicos, generando productos de carácter ácido, más solubles en medio acuoso y más fáciles de eliminar. Los ácidos biliares conjugados con taurina y glicina llegan al intestino donde son en parte absorbidos; el ciclo enterohepático asegura su recuperación. La taurina se une a otros compuestos, como ácido retinoico y sustancias extrañas (xenobióticos), facilitando su excreción.

La taurina está relacionada con varios procesos fisiológicos. Tendría una función neuromodulatoria, participa en la estabilización del potencial de membrana en músculo, posee capacidad antioxidante y antiinflamatoria y actúa como osmolito.

La síntesis de taurina es insuficiente en niños de corta edad y más aún en prematuros. La leche materna tiene una concentración de taurina de unos 400 μmoles por litro, lo que asegura una provisión adecuada. Las fórmulas que sustituyen a la leche materna contienen muy poca taurina.

Usos sin fundamento científico. Es común el expendio de bebidas "energizantes" que contienen taurina, a veces también cafeína, publicitadas como potenciadores del rendimiento físico. No hay evidencia de que, en personas normales, el consumo de ese tipo de productos tenga efecto beneficioso alguno.

CARNITINA

La carnitina (ácido 3-hidroxi-4N-trimetilaminobutírico) (fig. 27-41) es un ácido con función amonio cuaternario. En los organismos vivientes se la encuentra libre o esterificada con ácidos grasos. Se sintetiza principalmente en hígado (también en músculo) a partir de lisina y metilos cedidos por S-adenosilmetionina.

Los alimentos de origen animal proveen buena cantidad, no así las frutas y hortalizas, pobres en carnitina. Es absorbida en intestino, pasa a la sangre y es captada por la mayoría de los tejidos. Se concentra principalmente en músculo esquelético, donde su concentración es hasta 50 veces superior a la del plasma.

Funciones. La principal función metabólica de la carnitina es su participación en el sistema que transfiere ácidos grasos desde el citosol hacia la matriz mitocondrial para su oxidación total (pág. 300).

Deficiencia de carnitina. La carnitina no es nutriente esencial en humanos; la síntesis endógena cubre las necesidades. No se han descrito cuadros de deficiencia en adultos. Son más vulnerables los recién nacidos, particularmente prematuros, cuya capacidad para sintetizarla es pobre, o niños de corta edad alimentados con leche de soja, que no contiene carnitina. En estos casos se produce hipoglucemia y depresión de la oxidación de ácidos grasos. Se aconseja suplementar las fórmulas utilizadas como substituto de la leche materna.

Usos sin fundamento científico. En la creencia de que suplementos de carnitina pueden mejorar la función y rendimiento muscular, se ha propuesto adicionar varios gramos por día a la dieta habitual para potenciar el desempeño de

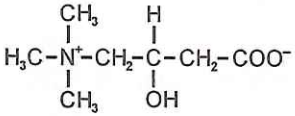


Fig. 27-41. Carnitina.

Fig. 27-42. Inositol.

atletas de alta competición o aumentar la capacidad muscular de sujetos normales. No existen evidencias que avalen esta práctica.

INOSITOL

Es un hexahidroxiciclohexano, compuesto del cual existen nueve isómeros. El *mesoinositol*, también llamado *mioinositol* (fig. 27-42), es el más importante en la naturaleza y el único isómero activo.

En todas las células se sintetiza inositol-1-fosfato a partir de glucosa-6-fosfato. En alimentos vegetales hay importantes cantidades de inositol-fosfato, entre ellos el hexafosfato o ácido fítico, un quelante de calcio, hierro, magnesio y zinc, con los cuales forma productos insolubles, no absorbibles. Está ampliamente distribuido en alimentos naturales; se lo encuentra en frutas, carne, leche, nueces, legumbres, cereales enteros.

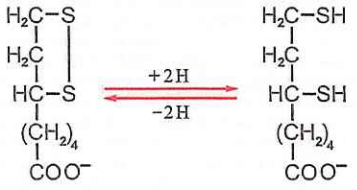
Se encuentra en moléculas de fosfolípidos como el fosfatidilinositol (PI), fosforilado en los carbonos 4 y 5; la hidrólisis de este compuesto da inositol-4,5-bisfosfato (IP_2), integrante de un sistema de transmisión de señales (pág. 496).

En los años recientes se han presentado evidencias sobre el papel de compuestos como los inositol polifosfatos e inositol pirofosfatos (IP7, inositolpentaquisfosfato e inositolhexaquisfosfato) cumplen acciones muy diversas en: el metabolismo energético, en la exocitosis, respuesta a infecciones y estrés, apoptosis, inhibición de la respuesta celular a inositol-3,4,5-trisfosfato (IP3).

Otra molécula que tiene inositol es el glicosilfosfatidilinositol, que sirve de dispositivo de anclaje de proteínas a la cara externa de membranas celulares.

En animales de laboratorio se han estudiado las consecuencias de la deficiencia de inositol. En ratones, se produce alopecia, fallas en la lactancia y retardo del crecimiento. El inositol, junto con colina, posee efecto lipotrópico, esto es, facilita la movilización de depósitos grasos en hígado.

No se ha probado que sea un nutriente esencial en humanos, ya que la producción endógena satisface los requerimientos normales.



Acido lipoico (oxidado) — Acido lipoico (reducido)

Fig. 27-43. Ácido lipoico.

ÁCIDO LIPOICO

También llamado *ácido tióctico*, es el ácido 6,8-ditio-octanoico. Algunos autores lo incluyen entre los miembros del complejo B, pero no es un requerimiento dietario en mamíferos. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, en sus formas oxidada y reducida (fig. 27-43). En los alimentos se une a restos lisina de proteínas. Hígado, riñón, corazón, levadura, espinaca y arvejas son excelentes fuentes.

El ácido lipoico de los alimentos es liberado en intestino de su unión a proteínas, absorbido y convertido en dihidrolipoico. Es una de las coenzimas integrantes de los sistemas multienzimáticos que catalizan la descarboxilación oxidativa de α-cetoácidos (*deshidrogenasas de piruvato*, de α-*cetoglutarato* y de α-*cetoácidos de cadena ramificada*). El ácido dihidrolipoico es un agente antioxidante activo contra radicales hidroxilo, ácido hipocloroso y oxígeno singulete. El dihidrolipoico puede reducir las formas oxidadas de vitaminas C y E. No se justifica la ingesta de suplementos en individuos sanos.

RESUMEN

Las vitaminas son compuestos orgánicos esenciales para el desarrollo normal y mantenimiento de la salud. No se sintetizan en el organismo y deben ser provistas por la alimentación. Algunas son o integran coenzimas, otras actúan como hormonas. Su carencia produce cuadros patológicos específicos (avitaminosis). Se dividen en liposolubles (A, D, E y K) e hidrosolubles (B y C).

Vitaminas liposolubles. Vit. A (retinol, axeroftol). Retinal y ácido retinoico son derivados activos. Los carotenos son precursores o provitaminas. La vitamina existe en alimentos de origen animal; los carotenos, en vegetales pigmentados. En las células el retinol es oxidado a retinal y éste a ácido retinoico. Esta última reacción es irreversible. En el núcleo celular se asocia a receptores (RAR y RXR) que se dimerizan y fijan a sitios específicos del ADN. *Avitaminosis*. Lesiones epidérmicas (hiperqueratosis, descamación) y oculares (xeroftalmía), compromiso del epitelio traqueobronquial. El primer síntoma de las deficiencias es la ceguera nocturna. *Papel funcional*. Modula la actividad de diversos genes, participa en la regulación de la división y proliferación celular y en la síntesis de glicoproteínas. Estimula el desarrollo de linfocitos B y T auxiliares. El ác. retinoico promueve la diferenciación celular y la apoptosis. Tiene también acciones no genómicas. El retinal interviene en el proceso de la visión. Los bastoncillos poseen rodopsina, cuyo grupo prostético es 11-cis-retinal. La incidencia de luz convierte el isómero cis en todo trans y desencadena el estímulo luminoso: el todo trans retinal es reducido a retinol. Reacciones catalizadas por deshidrogenasa e isomerasa convierten el retinol trans en retinal 11-cis. La falta de vit. A retarda este ciclo y explica la ceguera nocturna.

Vit. D (calciferol, vit. antirraquítica). Deriva de esteroles. Es escaso en los alimentos naturales. En el organismo se sintetiza una provitamina, el 7-deshidrocolesterol, que se convierte en vitamina D por exposición de la piel al sol (rayos ultravioletas). Para adquirir actividad, la vit. D debe ser modificada. En el hígado es hidroxilada a 25-OH-D_3, que pasa a la sangre. En riñón se produce una nueva hidroxilación para formar 1,25-$(OH)_2$-D_3 o *calcitriol*, el metabolito más activo. En el núcleo el calcitriol se une a receptores (VDR y RXR) que se fijan a ADN. *Avitaminosis*. En niños pequeños, raquitismo (fallas en la calcificación, deformaciones óseas, retardo y anomalías en la erupción dentaria); en adultos, osteomalacia (desmineralización del hueso). *Papel funcional*. Regula la homeostasis del Ca^{2+} y posiblemente de fosfatos. En intestino estimula la absorción de Ca^{2+} (síntesis de calbindina); en hueso aumenta la actividad de resorción; en riñón activa la reabsorción de Ca^{2+} y fosfatos; en paratiroides inhibe la síntesis y secreción de PTH. También es un factor en la regulación de diferenciación y maduración celular. Sus acciones son genómicas y no genómicas.

Vit. E (tocoferol). Presente en aceites de maíz, maní y soja, en germen de trigo. *Avitaminosis*: rara en el hombre. Aumenta la fragilidad de glóbulos rojos y creatinuria. En niños, anemia y disminución de la vida media de eritrocitos. *Papel funcional*: antioxidante.

Vit. K (vit. Antihemorrágica). Deriva de naftoquinona. Sensible a la luz. Se encuentra en repollo, coliflor, espinaca, tomate, queso, huevo, hígado. Sintetizada por bacterias de la flora intestinal. *Avitaminosis*. Retardo de la coagulación. *Papel funcional*: cofactor de la carboxilasa que forma γ-carboxiglutamato en proteínas Gla, indispensables para la formación de los factores II (protrombina), VII, IX y X de la coagulación.

Vitaminas hidrosolubles. Complejo vitamínico B. Tiamina (vit. B_1, aneurina). Se descompone por calentamiento en ambiente húmedo. Se encuentra en granos de cereales enteros, carne porcina, hígado, legumbres, levadura de cerveza. Los requerimientos son mayores en alcoholistas y en personas que ingieren carbohidratos en exceso. *Avitaminosis*. Beriberi, debilidad, fatiga, cefaleas, insomnio, mareos, inapetencia, taquicardia, neuritis, parálisis. En algunos casos predominan los síntomas neurológicos, en otros, los cardiovasculares. *Papel funcional*: la forma activa es pirofosfato de tiamina, coenzima de sistemas multienzimáticos que catalizan descarboxilación de α-cetoácidos. También es coenzima de transcetolasa. El trifosfato de tiamina está relacionado con la transmisión del estímulo nervioso.

Riboflavina (vit. B_2). Se descompone por exposición a la luz. En la leche, hígado, riñón, carnes, pescados, yema de huevo, espinaca, tomate, zanahoria. *Avitaminosis*: glositis, fisuras en las comisuras de los labios, queilosis, seborrea, conjuntivitis. *Papel funcional*: integra las moléculas de FMN y FAD, coenzimas de oxidorreductasas.

Niacina (vit. B_3). Ácido nicotínico y nicotinamida, ambos activos. En hígado, carnes, huevo, granos enteros. *Avitaminosis*: Pelagra (dermatitis, glositis, estomatitis, náuseas, vómitos, enteritis, diarrea, síntomas neurológicos y mentales). *Papel funcional*: integra las moléculas de NAD y NADP, coenzimas de oxidorreductasas. El NAD participa en ADP-ribosilación de proteínas, y en la formación de ácido nicotínico adenosina fosfato (NAADP) y a ADP ribosa cíclico, agentes movilizadores de Ca^{2+}.

Ácido pantoténico (vit. B_5). Se encuentra en todos los alimentos. No se observa avitaminosis en humanos. *Papel funcional*: integra la coenzima A y la fosfopanteteína. Actúa en transferencia de acilos; la acetil-CoA es una importante encrucijada metabólica. El succinil-CoA es intermediario del ciclo de Krebs y participa en la síntesis de hemo. La fosfopanteteína, fijada a la proteína transportadora de acilos, integra la proteína multifuncional ácido graso sintasa.

Piridoxina (vit. B_6). Se oxida a piridoxal o adiciona amina para dar piridoxamina, ambos activos. En granos de cereales enteros, repollo, legumbres, hígado, carne de cerdo. *Avitaminosis*: rara en el hombre. Alteraciones cutáneas, trastornos gastrointestinales, anemia, depresión nerviosa y confusión mental. *Papel funcional*: la forma activa es piridoxal fosfato, coenzima de muchas reacciones del metabolismo de aminoácidos (transaminación, descarboxilación, desaminación, etc) y síntesis de hemo, contribuye al mantenimiento de la estructura de la glucógeno fosforilasa, modula la expresión génica y el sistema inmunitario.

Biotina. En hígado, riñón, leche, yema de huevo, tomate, levadura. Sintetizada por bacterias de la flora intestinal. No se observa avitaminosis en humanos. La avidina de clara de huevo cruda impide su absorción en intestino. *Papel funcional*: es coenzima de carboxilasas (acetil-CoA y piruvato carboxilasas), influye en el empaquetamiento de la cromatina, en la regulación de la expresión génica, y es necesaria para el funcionamiento de células T y B del sistema inmune.

Ácido fólico (ácido pteroilglutámico, vit. B_9). En legumbres, hígado riñón, levadura. *Avitaminosis*. Anemia megaloblástica, alteraciones cardiovasculares, aumento de homocisteína en plasma y tejidos. La deficiencia en la madre produce perturbaciones del desarrollo del sistema nervioso en el embrión. *Papel funcional*: como ácido tetrahidrofólico,

es coenzima de transferencia de restos monocarbonados, importantes en la síntesis de purinas, timina, metabolismo de aminoácidos).

Cobalamina (vit. B_{12}). Posee cobalto. En hígado, riñón, carne, leche, huevo; casi inexistente en vegetales. Para su absorción en intestino requiere factor intrínseco, glicoproteína secretada en mucosa gástrica. *Avitaminosis*: anemia megaloblástica, lesiones del sistema nervioso. La ausencia de factor intrínseco por reacciones autoinmunes impide la absorción de vit. B_{12} y determina un grave cuadro llamado anemia perniciosa. *Papel funcional*: como metilcobalamina es coenzima, junto con metiltetrahidrofolato, en la conversión de homocisteína en metionina. Como desoxiadenosil-cobalamina es coenzima en la reacción de isomerización de L-metilmalonil-CoA a succinil-CoA.

Ácido ascórbico (vit. C). Enérgico reductor; se inactiva fácilmente en solución neutra o alcalina. Abundante en frutos cítricos, tomates, vegetales frescos. Se pierde por la cocción o conservación de los alimentos. *Avitaminosis*: Escorbuto (dolores articulares, petequias, anemia, hematomas en napa, inflamación de encías). *Papel funcional*: participa en procesos de oxidorreducción (síntesis de OH-lisina e OH-prolina en el colágeno, síntesis de catecolaminas, reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} para su absorción en intestino).

BIBLIOGRAFÍA

Ball G.F.M. (2004) *Vitamins. Their Role in the Human Body*. Blackwell Publishing Ltd. Oxford.

Bender D.A. (2003). *Nutritional Biochemistry of the Vitamins*, 2nd Edition, Cambridge University Press, Cambridge.

Blanco A. (2009). *Micronutrientes. Vitaminas y Minerales*. Edit. Promed, Buenos Aires.

Bowman B.A., Russell R.M. (eds.). (2003). *Conocimientos Actuales sobre Nutrición*, 8va Edición, Organización Panamericana de la Salud, Washington.

Dusso A., Brown A.J., Slatopolsky E. (2005). Vitamina D. *American Journal of Physiology (Renal Physiology)*, 289: F8-F28.

Gropper S.S., Smith J.L., Groff J.L. (2005). *Advanced Nutrition and Human Metabolism*, 4th Edition, Thompson Wadsworth, Belmont.

Shils M.E., Shike M., Ross A.C., Caballero B., Cousins R.J. (eds.). (2006). *Modern Nutrition in Health and Disease*, 10th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia.

World Health Organization and FAO of the United Nations. (2004). *Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition: Report of a joint FAO/WHO expert consultation*. Bangkok.

Zempleni J., Rucker R.B. McCormick D.B., Suttie J.W. (eds.). (2007). *Handbook of Vitamins*. 4th Edition, pp. 559-570, CRC Press, Boca Raton.

CAPÍTULO 28

Balance hídrico y equilibrio ácido-base

El estudio del balance del agua y de los electrólitos constituye un capítulo de especial importancia.

El agua es el solvente en el cual transcurren casi todas las reacciones bioquímicas. Además de los nutrientes provistos a las células, los compuestos sintetizados por ellas y los productos de desecho metabólico, el agua del organismo contiene en solución sustancias minerales, muchas de las cuales se disocian en iones, comportándose como electrólitos.

El agua es el componente cuantitativamente más importante en la mayoría de seres vivos. En humanos representa alrededor del 65% de la masa corporal en el varón adulto; en la mujer constituye el 60% de la masa corporal. Esta diferencia se debe principalmente a la mayor proporción de tejido adiposo en la mujer. En general, la cantidad relativa de agua disminuye con la edad. En niños prematuros es de hasta 80%; en recién nacidos normales alcanza a 75% y luego disminuye lentamente hasta 70-65% poco después del año de vida. Esta proporción se mantiene hasta la adultez. Desde los 60 años en adelante el porcentaje se reduce progresivamente a valores alrededor del 50%, especialmente debido a disminución de la masa muscular.

La proporción de agua en diferentes tejidos y órganos varía notablemente. Por ejemplo, la piel posee 72%; el músculo, 75%; el hueso, 22%; el hígado, 68%; el riñón, 82%; el intestino, 74%; el tejido adiposo, 10%.

En el individuo normal, el contenido de agua total se mantiene más o menos estable dentro de estrechos límites; es una constante con mecanismos de regulación propios.

Como el contenido de agua total guarda relación con la cantidad de tejido adiposo, la proporción de la masa corporal correspondiente al agua disminuye a medida que aumenta el porcentaje de grasa. El agua total es relativamente reducida en obesos.

Determinación del agua total. El agua total puede medirse por técnicas de dilución de solutos que atraviesan fácilmente las membranas celulares y se distribuyen uniformemente en todo el cuerpo. Se procede a administrar una cantidad conocida de la sustancia y cuando su concentración se ha equilibrado en todos los tejidos se determina su concentración en plasma sanguíneo. El volumen de agua total (VT), en litros, se calcula con la fórmula:

VT = Cantidad administrada (mg)/Concentración (mg/L)

Se utilizan para esta determinación antipirina, tiourea y compuestos con isótopos (óxidos de deuterio o tritio).

Una técnica de uso más reciente es el análisis de *impedancia bioeléctrica*. La medición de impedancia eléctrica de los tejidos del cuerpo provee estimación del agua total, masa libre de grasa y grasa corporal. Además de determinar la adiposidad, está siendo utilizada para calcular la masa celular y agua corporal total en diferentes condiciones clínicas.

Distribución del agua en el organismo

La gran masa de agua del organismo está repartida en diferentes "compartimientos". Se distinguen dos grandes compartimientos: *intracelular* y *extracelular*.

a) Intracelular (IC). Limitado por las membranas plasmáticas, cuya permeabilidad selectiva es responsable de la sustancial diferencia de composición química entre el líquido encerrado en las células y el intersticial. Este compartimiento contiene dos tercios del agua corporal total, unos 27 litros en un varón adulto de 70 kg de peso. No hay métodos directos para la medición del agua IC. Se la obtiene por diferencia después de determinar agua total y extracelular.

b) Extracelular (EC). Claude Bernard lo llamó "*medio interno*". Todas las células se encuentran inmersas en este líquido; de él reciben los nutrientes necesarios para sus procesos anabólicos (de síntesis) y en él vierten sus desechos catabólicos. La capacidad para regular la composición del medio interno ha sido el eslabón evolutivo que permitió a los seres vivos independizarse del medio externo. Los procesos fisiológicos de regulación general tienden a mantener la constancia de este medio interno.

El compartimiento extracelular comprende los líquidos *intravascular* e *intersticial*. El líquido *intravascular* o plasma sanguíneo se encuentra confinado en el sistema canalicular del aparato circulatorio. El líquido *intersticial* toma contacto directo con los cuerpos celulares, bañados por él. En el espacio EC se encuentra 20% del agua total, aproximadamente 12 litros en un adulto normal de 70 kg. A través de la pared de los capilares se realiza un activo intercambio entre los líquidos intravascular e intersticial.

La distribución relativa del agua corporal entre los distintos compartimientos se indica en la tabla 28-1.

A los compartimientos mencionados debe agregarse otro, el *transcelular*, que comprende el líquido contenido en la luz de los tractos digestivo, urinario y respiratorio; los líquidos cefalorraquídeo, pleural, pericárdico y sinovial y el humor acuoso del globo ocular. La suma de estos líquidos representa sólo 2,5% del total (aproximadamente 1 litro).

Cada uno de los espacios fluidos está separado por membranas que permiten el pasaje de agua y de algunos solutos. Moléculas pequeñas (O_2, CO_2, urea) se mueven libremente entre todos los compartimientos, pero otras sustancias tienen restringidos sus movimientos. Las proteínas del plasma, por ejemplo, están confinadas en el espacio intravascular; la pared de los capilares no es permeable a macromoléculas.

El líquido intersticial no es fisiológicamente uniforme. Consta de una fase libre, en intercambio con los otros compartimientos, y otra fase parcialmente "secuestrada" en la red de la matriz del hueso y tejido conjuntivo denso. Las fibras colágenas mineralizadas del hueso y la sustancia fundamental del conectivo formada por los polímeros aniónicos de glicosaminoglicanos unen selectivamente cationes y retienen agua en una red casi cristalina. Por esta razón, una fracción importante del agua total (~10%) no intercambia fácilmente con el resto de líquidos orgánicos.

Consideradas de manera simplista, las diferencias químicas entre compartimientos pueden resumirse a los siguientes rasgos principales: el líquido intravascular o plasma sanguíneo posee numerosas sustancias de masa molecular pequeña o cristaloides, en solución verdadera, y proteínas (7 g por dL) en dispersión coloidal. Estas últimas, de gran tamaño molecular, no pueden atravesar las paredes capilares, que actúan como una membrana de diálisis. El líquido intersticial tiene una composición muy similar al plasma en cuanto a sustancias de pequeña masa, pero su contenido de proteínas es pobre. El líquido intracelular difiere notablemente de los anteriores en su composición.

Determinación del agua extracelular. Es posible medir el volumen de agua EC con la técnica de dilución de solutos que difunden únicamente en este compartimiento, por ejemplo inulina, ^{77}Br o sulfatos con ^{35}S. Estos últimos dan resultados más exactos. El volumen de agua del plasma se puede estimar con colorantes como el azul de Evans o albúmina marcada con ^{131}I o ^{125}I. En las mediciones de agua EC no se incluye el volumen de agua transcelular.

Balance hídrico

En condiciones de adecuado aporte dietético, la masa corporal de un adulto normal permanece

Tabla 28-1. Distribución del agua corporal en el ser humano.

	Agua total	*Líquido intracelular*	*Líquido extracelular*	*Líquido intersticial*	*Líquido intravascular*
Hombre (adulto)	65	45	15	10	5
Mujer (adulta)	60	40	15	10	5
Lactante	70	48	29	24	5

Las cifras indican porcentaje de la masa corporal.

constante a pesar de las variaciones habituales en la ingesta de agua. Ello indica que el contenido hídrico es regulado eficazmente.

La incorporación de agua se realiza por vía oral con los líquidos de bebida y con los alimentos sólidos, que pueden contener 40% o más de su peso en agua. Debe agregarse el agua generada en el organismo como producto metabólico final. Una dieta mixta balanceada produce alrededor de 12 g de agua por cada 100 Calorías consumidas.

El riñón está capacitado para mantener constante el volumen hídrico del organismo; elimina orina muy diluida cuando hay exceso de agua, o sumamente concentrada cuando es necesario retener agua. Por su parte, el mecanismo de la sed es el encargado de controlar el ingreso de agua al cuerpo. Hay pérdidas obligadas a nivel de la piel por perspiración insensible y por el pulmón, pues el aire espirado está saturado de vapor de agua. Estas pérdidas aumentan en ambientes de alta temperatura y sequedad atmosférica o en algunos estados patológicos (fiebre elevada por ej.). Normalmente, las pérdidas por aparato digestivo son escasas. En el tracto gastrointestinal se vierten por día unos 8 litros de agua, los cuales son reabsorbidos en su casi totalidad. En un adulto normal, en 24 horas se forman 1.000 mL de saliva, 2.000 mL de jugo gástrico, 500 mL de bilis, 1.500 mL de jugo pancreático y 3.000 mL de jugo intestinal.

En condiciones patológicas que provocan vómitos o diarreas, buena parte de ese líquido no es reabsorbido; las pérdidas de agua y electrólitos pueden ser considerables; se producen deshidratación y desequilibrios iónicos.

En la tabla 28-2 se exponen cifras del balance hídrico de un día en un adulto normal.

Tabla 28-2. Balance hídrico de un adulto normal (en 24 horas).

Ingresos		*Egresos*	
Bebidas	1.400 mL	Pérdida obligada (piel y pulmones)	850 mL
Alimento sólido	800 mL	Materia fecal	150 mL
Agua metabólica	300 mL	Orina	1.500 mL
Total	2.500 mL	Total	2.500 mL

Composición iónica de los líquidos corporales

La separación del agua del organismo en compartimientos intra- y extracelular tiene utilidad biológica y clínica. Si bien las denominaciones son esencialmente anatómicas, reflejan la división funcional y química resultante de la permeabilidad selectiva y actividad de los sistemas de transporte de sustancias de la membrana celular. Aun dentro de la célula, la composición química de los líquidos contenidos en las diversas estructuras subcelulares es diferente. Por ejemplo, las mitocondrias y el retículo endoplásmico poseen capacidad para concentrar determinados iones en su interior.

El sodio es el principal catión extracelular y el potasio es el más abundante del espacio intracelular. Entre los aniones, el cloruro es preferentemente extracelular y los fosfatos, proteinatos y sulfatos tienen mayor concentración en el espacio intracelular. Los líquidos de cada compartimiento del organismo poseen la misma concentración de aniones y cationes y son electroneutros. El agua difunde libremente a través de las membranas, razón por la cual la presión osmótica en todos los compartimientos es aproximadamente la misma.

Comparado con los otros compartimientos del organismo, los aniones y cationes tienen mayor concentración en el líquido intracelular. Esto implica que el número de partículas disueltas por litro y la presión osmótica intracelular son mayores que las del líquido intersticial. Como la presión osmótica resulta del número de partículas dispersas en un determinado volumen, independientemente de su carga eléctrica y/o capacidad de combinación, la diferencia entre la presión osmótica intra- y extracelular es mucho menor que lo sugerido por las concentraciones individuales de cada uno de los iones. En el líquido intracelular existe una buena proporción de iones con carga mayor que 1 y, por otra parte, algunos iones intracelulares están ligados a moléculas o estructuras y, por lo tanto, no cuentan desde el punto de vista osmótico.

De los tres compartimientos, el plasma sanguíneo es el más accesible al análisis. El líquido intersticial es un ultrafiltrado del plasma; su composición se calcula a partir de los valores del plasma, aplicando un factor de corrección (ver más adelante). La concentración de proteínas del líquido intersticial es menor que la del plasma.

El plasma contiene alrededor de 92% de agua y 8% de sólidos, principalmente proteínas y lípidos (la concentración de proteínas plasmáticas varía dentro del rango de 6 a 8 g por dL). Debido a ese 8% de sólidos, la concentración de solutos aumenta en ese porcentaje cuando es expresada por litro de agua del plasma. Así, si la concentración de Na^+ en plasma es 142 mEq/L, expresada en relación al agua del plasma es 153 mEq/L. El

Na^+ es el catión predominante del plasma y su concentración se mantiene dentro de límites estrechos. Otros cationes, como K^+, Ca^{2+} y Mg^{2+}, se encuentran en cantidades mucho más reducidas. Los principales aniones del plasma son cloruro (Cl^-) y bicarbonato (HCO_3^-) (tabla 28-3). El líquido intersticial es un filtrado del plasma a través de las paredes de capilares, altamente permeables al agua, electrólitos y solutos de pequeña masa. Muy escasa es la cantidad de proteínas que atraviesa la pared capilar. En la linfa, líquido de composición similar a la del líquido intersticial, la concentración de proteínas es de 1 a 3 g por dL.

El movimiento de fluido a través de la pared capilar depende del equilibrio entre fuerzas hidrostática y osmótica (ver pág. 619). Hay una ligera diferencia entre las concentraciones de electrólitos en líquido intersticial y plasma, determinada por el equilibrio Gibbs-Donnan. La concentración de cationes difusibles es aproximadamente 4% más alta en plasma que en el intersticio, mientras la de aniones difusibles es menor en plasma en el mismo porcentaje.

Las partículas disueltas en los líquidos orgánicos son responsables de la fuerza osmótica que determina desplazamientos de agua entre compartimientos. Mientras Na^+, Cl^- y HCO_3^- son los principales responsables de la fuerza osmótica que mantiene el agua en el compartimiento extracelular, K^+, Mg^{2+}, fosfatos y diferentes sustancias orgánicas son los solutos osmóticamente dominantes en el interior de las células.

Aunque la composición del líquido IC varía en diferentes tipos celulares, en todos la concentración de K^+ es elevada (~150 mEq/L) y la de Na^+ es baja (~10 mEq/L). Otro catión presente en mayor concentración en el líquido IC es el Mg^{2+}, con alrededor de 26 mEq/L, comparada con 2 mEq/L en líquido EC. La composición de aniones de los líquidos IC y EC también difiere; las concentraciones de Cl^- y HCO_3^- son más bajas, y las de fosfatos y sulfatos más altas en el primero.

Equilibrio Gibbs-Donnan. Al pH de los líquidos biológicos (pH del plasma normal = 7,4) las proteínas actúan como aniones. Las proteínas, por su tamaño molecular, no pueden atravesar las membranas celulares ni las paredes capilares. La presencia de estos aniones, confinados en un espacio hídrico cerrado por membranas semipermeables que permiten la libre difusión de otros iones, trae aparejada una distribución desigual de los iones difusibles a ambos lados de la membrana. En esta distribución se cumplen tres requerimientos básicos:

a) La concentración total de aniones es igual a la de cationes en cada lado de la membrana.

b) En el sector que contiene proteínas las concentraciones de aniones difusibles son menores y las de cationes son mayores, comparadas con las de la fase sin proteínas.

c) La presión osmótica es ligeramente superior en el compartimiento con proteínas.

Supongamos dos compartimientos iguales (A y B de la figura 28-1), separados por una membrana semipermeable. En A se coloca una dispersión que contiene 5 mEq de proteína y 5 mEq de sodio. En B se agrega igual volumen de solución con 10 mEq de cloruro y 10 mEq

Tabla 28-3. Concentraciones de iones en plasma sanguíneo, líquido intersticial e intracelular (expresadas en mEq/L).

Cationes	*Plasma*	*Agua del plasma*	*Líquido instersticial*	*Líquido intracelular (músculo)*	*Jugo gástrico*	*Jugo pancreático*	*Sudor*
Sodio	142,0	152,7	147,5	13,0	60	130	45
Potasio	4,5	5,0	5,0	150,0	7	7	5
Calcio	5,0	5,4	4,0	1×10^{-7}	-	-	-
Magnesio	1,7	1,9	1,5	26,0	-	-	-
Total de cationes	153,2	165,0	158,0	189,0	-	-	-
Aniones							
Cloruro	102,2	110,0	113,0	3,0	100	60	58
Bicarbonato	26,0	28,0	28,5	10,0	0	100	0
Fosfatos	2,0	2,2	2,3	107,0	-	-	-
Sulfato	1,0	1,1	1,2	20,0	-	-	-
Ácidos orgánicos	6,0	6,5	6,0	-	-	-	-
Proteínas	16,0	17,2	7,0	49,0	-	-	-
Total de aniones	153,2	165,0	158,0	189,0	-	-	-

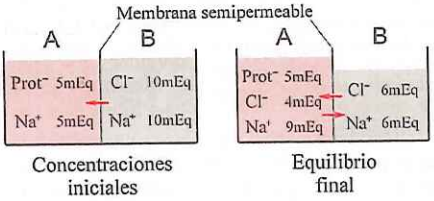


Fig. 28-1. Equilibrio Gibbs-Donnan.

de sodio. Después de un cierto tiempo se arriba a un equilibrio entre ambos compartimentos; la distribución de los iones habrá cambiado. En el lado A existirán, además de los 5 mEq de proteínas y 5 mEq de sodio iniciales, 4 mEq de cloruros y 4 mEq de sodio que difundieron desde el compartimiento B. En este último quedarán 6 mEq de cloruro y 6 mEq de sodio.

Si llamamos $[Na^+_A]$ y $[Cl^-_A]$ a las concentraciones de sodio y cloruro en el compartimiento A que contiene proteínas, y $[Na^+_B]$ y $[Cl^-_B]$ a las existentes en B, libre de iones no difusibles, una vez alcanzado el equilibrio se tienen las siguientes relaciones:

$$[Na^+_A] \cdot [Cl_A] = [Na^+_B] \cdot [Cl^-_B]$$

o bien:

$$\frac{[Na^+_A]}{[Na^+_B]} = \frac{[Cl^-_B]}{[Cl_A]}$$

La mezcla en ambos lados de la membrana es eléctricamente neutra, $[Na^+_B]$ es igual a $[Cl^-_B]$. En el compartimiento que contiene el ion no difusible $Prot^-$ se alcanza la electroneutralidad cuando existe suficiente Na^+ para contrarrestar las cargas de $Prot^-$ y Cl^-, de modo que:

$$[Na^+_A] > [Cl^-_A] \text{ y } [Na^+_A] + [Cl^-_A] > [Na^+_B] + [Cl^-_B]$$

La presión osmótica es mayor en el lado que contiene proteínas. Para cada especie iónica difusible existe un gradiente, de igual magnitud pero de sentido contrario, para cationes y aniones.

Entre plasma sanguíneo y líquido intersticial, separados por la pared de los capilares, se da una situación similar. Para calcular la concentración de aniones monovalentes en líquido intersticial, se multiplica la concentración determinada en plasma por el factor 1,05 (factor Donnan); para cationes monovalentes, el factor de corrección es 0,95.

El equilibrio Gibbs-Donnan explica por qué la suma de aniones y cationes es superior en el interior de las células, más rico en proteínas, que en el líquido intersticial. Sin embargo, no puede inferirse de la teoría de Gibbs-Donnan la desigual distribución de Na^+ y K^+, o de Ca^{2+}, a ambos lados de la membrana plasmática. Esta situación es mantenida por mecanismos de transporte activo que bombean Na^+ o Ca^{2+} fuera de la célula. Los sistemas de transporte existentes en las membranas celulares son los principales responsables de la diferencia en estructura iónica entre espacio intracelular e intersticio (ver pág. 213). Así la actividad de la Na^+,K^+-ATPasa cumple un papel fundamental en la distribución del Na^+, al mantener este catión como el más abundante en el espacio extracelular.

Presión osmótica de los líquidos corporales. La presión osmótica de una solución depende del número de partículas (iones y moléculas) presentes en un determinado volumen de solvente. Como el volumen de solvente varía con la temperatura y, por lo tanto, la concentración es modificada por los cambios térmicos, se prefiere expresar la concentración en número de partículas dispersas por unidad de masa del solvente (molalidad). Una solución que contiene un mol de partículas ($6{,}022 \cdot 10^{23}$) en 1.000 g de agua (solución 1 molal o 1 m) desarrolla una presión osmótica de 22,4 atmósferas y congela a –1,86°C (descenso crioscópico).

Un mol de partículas corresponde también a una unidad llamada *osmol*. Un *osmol* es la cantidad de partículas correspondiente al número de Avogadro; disuelto en 1.000 g de agua da una solución 1 *osmolal*.

Como la glucosa no se ioniza, 1 mol de hexosa disuelto en 1.000 g de agua (solución 1 m) produce 1 mol de partículas y su osmolalidad es 1. El NaCl en solución acuosa se ioniza completamente formando dos iones o partículas). Por esta razón, una solución 1 m de NaCl es 2 osmolal. El K_2SO_4 en solución forma tres iones (un SO_4^{2-} y dos K^+). Entonces, una solución 1 m de K_2SO_4 es 3 osmolal.

Un osmol de glucosa es igual a 1 mol; un osmol de NaCl es igual a 0,5 moles y un osmol de K_2SO_4, a 0,333 moles. En la práctica se utiliza la milésima parte del osmol o *miliosmol* (mOsmol).

A veces se habla indistintamente de osmolalidad y osmolaridad, lo cual no es correcto. La osmolaridad expresa la concentración en osmoles por litro de solución, mientras la osmolalidad, por 1.000 g de solvente (la misma diferencia existente entre molaridad y molalidad). A las temperaturas de interés biológico, cuando las concentraciones de soluto son bajas, el error que se comete al referir osmolaridad en lugar de osmolalidad no es muy acentuado.

Los compartimientos EC e IC están en equilibrio osmótico, de modo que ambos tienen una concentración osmolar similar. Los desplazamientos de agua son condicionados por la concentración de solutos osmóticamente activos a cada lado de la membrana. En los líquidos extracelulares (LEC) prácticamente la totalidad de la presión osmótica se debe a iones y moléculas de pequeña masa, que atraviesan fácilmente las paredes de los capilares. Determinaciones en plasma sanguíneo brindan información sobre la osmolalidad extracelular, debida fundamentalmente a la concentración por kg de agua de los solutos activos sodio y aniones acompañantes y, en menor proporción, glucosa y urea.

La presión osmótica del plasma puede medirse directamente por *crioscopia*. Si se determina el punto de congelamiento del plasma es posible calcular su concentración en partículas osmóticamente activas (el descenso crioscópico, una de las propiedades coligativas, está relacionado con la concentración de partículas). El plasma normal congela a –0,56°C; por lo tanto, su *osmolalidad* es –0,56/1,86 = 0,301 osmoles por kg de agua. En la práctica no se comete error apreciable si se afirma que la *osmolaridad* normal del plasma está alrededor de 300 mOsmoles por litro.

La determinación de concentraciones de sodio, glucosa y urea en plasma también permite calcular la osmolaridad mediante la siguiente fórmula:

$$\text{mOsmol / kg} = 2[\text{Na}^+] + \frac{[\text{glucosa}]}{18} + \frac{[\text{N de urea}]}{2{,}8}$$

La concentración de Na^+ (habitualmente expresada en mEq/L) se multiplica por 2 para incluir los aniones acompañantes; las concentraciones de glucosa y nitrógeno de urea (expresadas en mg/dL) se dividen por 18 y 2,8 respectivamente para obtener el valor en mEq/L (masa molecular de la glucosa, 180; peso de 2 átomos de N de la urea, 28).

Las sustancias no electrolíticas aportan muy poco a la presión osmótica del plasma. Normalmente a la glucosa le corresponden 5 mOsmol/kg. Sólo en casos de diabetes con hiperglucemias muy elevadas puede alcanzar alguna significación. Por otro lado, como la urea atraviesa las membranas y se equilibra rápidamente en todos los compartimientos, no es *osmóticamente efectiva*. En condiciones normales no se comete error importante si se infiere la presión osmótica efectiva del LEC a partir de la concentración de sodio en plasma.

$$\text{Presión osmótica efectiva (mOsmol/kg)} = 2[\text{Na}^+]$$

La osmolalidad efectiva es también designada *tonicidad*. Las soluciones con osmolalidad efectiva igual a la de los líquidos corporales son *isotónicas*; por ejemplo, una solución de NaCl 0,9 g/dL (solución fisiológica). Las soluciones con osmolaridades mayores o menores que la del plasma se conocen como hipertónicas o hipotónicas respectivamente.

Presión oncótica. Una muy pequeña fracción de la presión osmótica total del plasma se debe a las proteínas; es lo que se conoce como presión oncótica o coloidosmótica. Pese a su reducido valor absoluto, la presión oncótica generada por las proteínas plasmáticas tiene gran importancia funcional, ya que influye el movimiento de iones difusibles a través de la membrana celular. En realidad, la presión oncótica que ejercen las proteínas del plasma es mayor que la correspondiente a su concentración. La diferencia es debida en parte al equilibrio Gibbs-Donnan, ya que existe mayor número de partículas en solución en el espacio intravascular que en el intersticio. El equilibrio Gibbs-Donnan establece que:

$$[\text{Na}^+]_p \cdot [\text{Cl}^-]_p = [\text{Na}^+]_i \cdot [\text{Cl}^-]_i \quad (1)$$

donde los subíndices p e i corresponden a plasmático e intersticial respectivamente.

Las concentraciones de Na^+ y Cl^- en el intersticio difieren menos entre sí que en el plasma. La diferencia entre Na^+ y Cl^- en el agua del plasma es unos 15 mEq/kg mayor (promedio de las proteínas del plasma) que la del intersticio. Si suponemos 145 mEq/kg para Na^+ y Cl^- en el intersticio:

$$[\text{Na}^+]_i \cdot [\text{Cl}^-]_i = 145 \cdot 145$$

según la ecuación (1) este producto debe ser igual a $[Na^+]_p \cdot [Cl^-]_p$

$$[\text{Na}^+]_p = 152{,}7 \text{ mEq/kg} \quad \text{y} \quad [\text{Cl}^-]_p = 137{,}7 \text{ mEq/kg}$$

El resultado neto es mayor concentración total de Na^+ y Cl^- en agua del plasma que en el líquido intersticial (145 + 145 = 290; 152,7 + 137,7 = 290,4). La diferencia de 0,4 mEq/kg o 0,4 mOsmol/kg parece pequeña, pero es significativa. La concentración normal de proteínas del plasma es de 0,9 a 1 mmol/kg; en consecuencia, el efecto osmótico total de las proteínas plasmáticas aumenta, por efecto Gibbs-Donnan, de 0,9 mOsmol/kg a 1,3 mOsmol/kg. Como 1 mOsmol/kg genera una presión osmótica de 19,3 mm Hg, este efecto aumenta la presión oncótica en el capilar de 0,9 · 19,3 = 17,4 mm Hg a 1,3 · 19,3 = 25-26 mm Hg.

El intercambio hídrico entre el plasma sanguíneo y el líquido intersticial es regulado por el balance entre las fuerzas opuestas de presión

hidrostática y presión oncótica. Una importante función de las proteínas del plasma es la de actuar como factor regulador del intercambio de líquido entre la sangre circulante y el espacio intersticial. Este intercambio se realiza a nivel de los capilares, cuyas paredes son fácilmente permeables al agua y a sustancias de pequeña masa molecular en ella disueltas, pero no se dejan atravesar por macromoléculas como las de proteínas. Por esta razón, la concentración de sustancias en solución verdadera es semejante en el plasma y en el líquido intersticial y la presión osmótica que de ellas depende es prácticamente la misma a uno y otro lado de la pared del capilar. En cambio, hay una notable diferencia en la concentración de proteínas de los líquidos separados por esa pared, lo que determina que la presión oncótica ejercida por las partículas de proteínas dispersas tienda a atraer agua hacia el interior del lecho vascular.

Por otra parte, la presión hidrostática a que está sometida la sangre en el capilar tiende a expulsar líquido hacia el intersticio.

La relación entre filtración desde el capilar y el gradiente de presiones oncóticas a través de la pared del vaso se expresa en la ley de Starling:

$$\text{Filtración neta} = \text{LpS} \; (\Delta P_{cap} - \Delta P_{onc})$$

donde Lp es permeabilidad de la pared capilar; S, superficie disponible para el movimiento de agua; ΔP_{cap}, diferencia de presión hidrostática entre el interior del capilar y el espacio intersticial, y ΔP_{onc}, la diferencia de presión oncótica entre capilar e intersticio.

El siguiente ejemplo ilustrará este mecanismo. Debido a la diferencia en la concentración de proteínas, la presión coloidosmótica alcanza a unos 30 mm Hg en el plasma y sólo a 10 mm en el líquido intersticial. La diferencia de 20 mm Hg tiende a hacer ingresar agua desde el intersticio hacia el interior del capilar (a fin de simplificar, los valores indicados a título de ejemplo no son los reales sino solo una aproximación).

A esta fuerza se opone la presión a que está sometida la sangre en el capilar. En el segmento proximal o "arterial" de un asa capilar la presión hidrostática efectiva que tiende a impulsar el líquido fuera del capilar es de unos 30 mm Hg. A medida que la sangre circula, la presión va cayendo y en el extremo "venoso" o distal del capilar la presión hidrostática efectiva tiene un valor de unos 10 mm Hg.

La diferencia entre las fuerzas opuestas, presión hidrostática y osmótica de las proteínas, resulta de unos 10 mm Hg a favor de la primera en el sector arterial del capilar y determina el paso de agua y solutos al espacio intersticial. En el segmento venoso del capilar la situación se invierte; la diferencia es de 10 mm Hg a favor de la presión oncótica, lo cual hace retornar líquido al torrente sanguíneo (fig. 28-2).

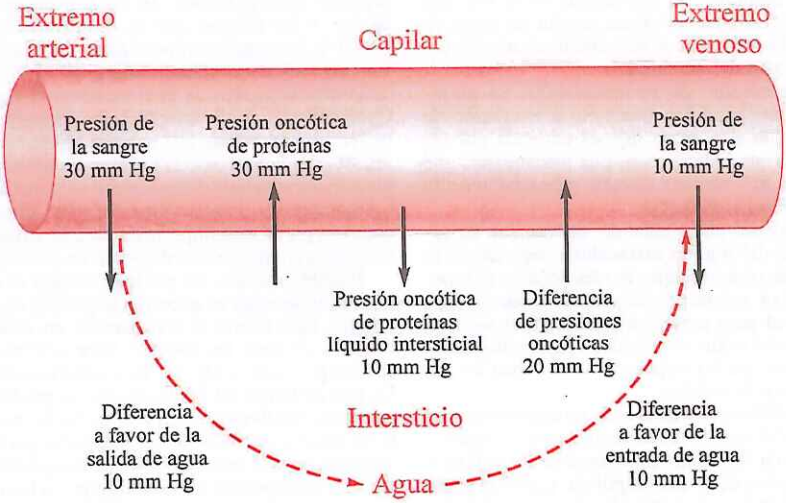


Fig. 28-2. Representación esquemática del fenómeno de Starling. Papel de las proteínas plasmáticas en el mantenimiento de la volemia.

A excepción de la presión oncótica dentro del capilar, los valores son muy difíciles de medir con exactitud. Además, no son uniformes en todo el organismo; existen notables diferencias entre distintos tejidos y aun entre diferentes zonas de un mismo órgano.

El intercambio acuoso descripto se conoce como equilibrio de Starling y asegura el mantenimiento del volumen de líquido circulante. Alteraciones de este mecanismo pueden determinar acumulación de líquido en el espacio intersticial, síntoma muy común en clínica (*edema*).

Regulación del volumen y osmolalidad del líquido extracelular. El compartimiento extracelular dispone de sistemas encargados de mantener la constancia de su volumen y osmolalidad (como ya se indicó, puede utilizarse el término osmolaridad sin cometer error significativo). Los mecanismos homeostáticos que regulan la osmolalidad del LEC no son idénticos a los responsables de mantener su volumen, pero ambos están estrechamente relacionados entre sí. La osmolalidad depende de la relación soluto/agua, mientras que el volumen EC está determinado por las cantidades absolutas de Na^+ y agua presentes. El volumen del espacio extracelular depende de su osmolalidad y ésta, en gran medida, es determinada por su contenido de sodio; de allí que muchos de los factores que regulan la osmolalidad operan sobre la concentración de sodio en el LEC.

El riñón, excretando orina cuyo volumen y concentración salina varían dentro de límites muy amplios y el mecanismo de la sed, que controla el ingreso de agua, juegan un papel de primera importancia en el mantenimiento del balance hídrico del organismo.

La regulación de la osmolalidad se alcanza mediante modificaciones en la excreción de agua en riñón, o en su ingesta activada por los estímulos que inducen sed. Los mecanismos que controlan el volumen afectan primariamente la excreción urinaria de Na^+.

El sistema encargado de monitorear la osmolalidad del líquido extracelular depende de la función de osmorreceptores ubicados en el hipotálamo. Los receptores de presión o barorreceptores, en el seno carotídeo, arco aórtico, arterias aferentes del riñón, en grandes venas pulmonares y aurículas, son los responsables de captar las variaciones en la volemia.

Las señales generadas en los osmorreceptores regulan el centro de la sed en el cerebro y estimulan la liberación de *hormona antidiurética* (HAD) o *vasopresina* de la neurohipófisis. La HAD actúa estimulando la reabsorción de agua en los túbulos distales y colectores del riñón. Los barorreceptores en cambio dirigen la producción y liberación no solo de HAD, sino también de *aldosterona* y *péptido natriurético atrial* (PNA). La aldosterona se secreta en la corteza suprarrenal por acción, principalmente, del sistema renina-angiotensina; La aldosterona estimula la reabsorción de Na^+ y la excreción de K^+ en los túbulos distales y colectores del riñón. El PNA se libera en los cardiocitos (de las aurículas del corazón) en respuesta a barorreceptores cardíacos; este péptido aumenta la tasa de filtración glomerular y la excreción de Na^+ por orina.

Se ha indicado ya el papel que las proteínas del plasma juegan sobre la regulación del volumen de líquido intravascular. El volumen del espacio extracelular depende de su osmolalidad y ésta, en gran medida, es determinada por su contenido de sodio; muchos de los factores que regulan la osmolalidad operan sobre la concentración de sodio en el LEC.

Alteraciones del equilibrio hídrico

Los trastornos del balance hídrico por reducción del agua corporal (deshidratación) o exceso (hiperhidratación) suelen acompañarse de cambios en la concentración extracelular de electrólitos. Cuando la osmolalidad del LEC se mantiene, el trastorno es *isotónico*; cuando aumenta o disminuye, es *hipertónico* o *hipotónico* respectivamente. Como la presión osmótica del LEC depende principalmente de las concentraciones de Na^+ y los aniones que lo acompañan (Cl^- y CO_3H^-), los cambios hipertónicos o hipotónicos van generalmente acompañados de variaciones en la concentración de esos iones en el plasma. Considerando como referencia la concentración de Na^+, los trastornos del balance hídrico se manifiestan en la mayoría de los casos como aumentos o disminuciones de ese catión (hipernatremia o hiponatremia respectivamente). Esto se utiliza como un parámetro importante para la corrección del trastorno hidroelectrolítico en un paciente.

Deshidratación. Se produce cuando el organismo pierde agua en exceso a la pérdida de electrólitos. Esto ocurre si una persona no recibe la cantidad de agua necesaria, o tiene pérdidas excesivas por sudoración intensa o hiperventilación. Un tipo particular de deshidratación se produce en pacientes con diabetes insípida, en donde, por falta de HAD o por fallo de los receptores para esta hormona a nivel renal, se produce una pérdida de agua no acompañada por electrólitos. En los casos mencionados, se habla de *deshidratación hipertónica*. En general, en esta alteración hay hiper-

natremia, con concentraciones de Na^+ en plasma que superan los 150 mEq/L. El compartimiento extracelular se torna hipertónico con respecto al intracelular; a fin de compensar la hipertonicidad; pasa agua desde las células al espacio extracelular. Si bien este mecanismo tiende a mantener el volumen de plasma circulante, resulta en una reducción del volumen celular. Esto afecta al sistema nervioso y es responsable de la irritabilidad, letargia y aun convulsiones que se ven en los casos avanzados de deshidratación hipertónica.

En los casos de deshidratación ocasionada por sudoración intensa, aun cuando se elimina un líquido relativamente hipotónico con respecto al plasma, esto puede determinar pérdida importante de sales. En personas que desarrollan trabajos físicos intensos en ambientes de temperatura elevada, el volumen de sudoración es considerable y con él se eliminan iones extracelulares, principalmente Na^+ y Cl^-. Si sólo se ingiere agua para reponer la pérdida, el cuadro se agrava. En estas situaciones se aconseja consumir bebidas con sales, por ejemplo, una solución acuosa de 1 a 1,5 g de NaCl por litro. Para todas las personas es recomendable ingerir mayor cantidad de sales durante los días cálidos, a fin de reponer las pérdidas adicionales ocasionadas por la mayor transpiración. En los casos agudos de deshidratación hipertónica, el volumen del compartimiento intravascular se debe reponer con soluciones salinas isotónicas (solución NaCl 0,9 g/dL).

Otro trastorno común en clínica es la pérdida paralela de agua y electrólitos. Esto ocasiona *deshidratación isotónica*, en la cual se encuentran concentraciones plasmáticas de Na^+ dentro del rango normal (entre 130 a 145 mEq/L). Se produce por diarreas, vómitos y fístulas, en las que se eliminan líquidos del tracto digestivo, o por hemorragias y quemaduras, en las cuales se pierde plasma. A pesar de existir disminución del líquido extracelular, como no hay cambios en osmolaridad, no se produce desplazamiento de agua sin electrólitos desde o hacia las células. De todas maneras, la pérdida inicial de fluido extracelular ocasiona movimiento tanto de agua como electrólitos desde las células, en un intento por compensar los cambios en el volumen de plasma circulante. Eventualmente, la reducción en la volemia se presenta, dependiendo de la severidad del caso, con hipotensión, e incluso shock hipovolémico si la perfusión tisular está muy comprometida.

Estos casos de deshidratación se tratan suministrando solución salina isotónica, la que se administra por vía oral en casos leves, o por vía parenteral en casos severos. Si se pretende corregir la deshidratación suministrando sólo agua o soluciones glucosadas y no se reponen correctamente los electrólitos, puede provocarse una expansión hipotónica del LEC, de muy serias consecuencias.

En la deshidratación producida por vómitos se elimina jugo gástrico, en cuya composición predominan Cl^- e H^+ y, en menor cantidad, Na^+ y K^+. La diarrea produce pérdida de Na^+, Cl^- y HCO_3^-, principales iones de las secreciones intestinal, pancreática y biliar eliminados con las deposiciones acuosas. La reducción del Na^+ del LEC va seguida de salida de K^+ de las células. Por esta razón, en el tratamiento de estos estados debe corregirse no sólo el desequilibrio del sodio, sino también el de otros iones.

La *deshidratación hipotónica* se observa cuando la pérdida de electrólitos supera a la de agua. Se produce en casos de tratamiento crónico con compuestos natriuréticos, o en insuficiencia de la glándula suprarrenal y deficiencia de aldosterona, en los que hay aumento en la excreción de Na^+ por orina. Para tratar de contrarrestar la caída en el volumen intravascular, el organismo incrementa la secrecion de HAD, lo que influye de manera negativa ya que esto ocasiona la reabsorción de agua en riñón, intensificando la hiponatremia. El cuadro se manifiesta con concentraciones de Na^+ plasmático menores a 130 mEq/L, lo que se acompaña de signos neurológicos, primero de irritabilidad y luego somnolencia. Como en los otros casos de deshidratación, aquí el déficit en el espacio extracelular debe corregirse con la infusión de soluciones salinas isotónicas. Además, para evitar el empeoramiento de la hiponatremia, se debe restringir el aporte de agua no acompañada de electrólitos.

Hiperhidratación. El exceso de fluido en el organismo puede o no presentarse con cambios en la osmolaridad de los líquidos corporales. La *hiperhidratacion isotónica* se presenta cuando hay acumulación paralela de agua y electrólitos en el espacio extracelular. Esto sucede en los edemas generalizados de la insuficiencia cardíaca, síndrome nefrótico, hipoproteinemias marcadas, o por la excesiva infusión de soluciones isotónicas por vía intravenosa. Como no existen alteraciones en la osmolaridad del espacio extracelular, no hay movimiento neto y aislado de agua entre los espacios extra e intravascular. El tratamiento en estos casos depende de la corrección de la causa subyacente. Se debe reducir la ingesta de sal y administrar diuréticos, lo que facilita la excreción de Na^+ y agua.

La *hiperhidratación hipotónica* resulta de aportes excesivos de agua, como en las infusiones de soluciones desprovistas de electrólitos (soluciones glucosadas). Se produce un síndro-

me conocido como intoxicación acuosa. Esto es frecuente en trastornos psicológicos que llevan a la ingesta exagerada de agua (polidipsia psicogénica), en deportistas que han ingerido agua sin electrólitos con el fin de rehidratarse, o en neonatos a los que se les ha provisto excesiva cantidad de agua. Otra causa de este tipo de hiperhidratación es la producción exagerada de HAD. Esto se conoce como síndrome de secreción inapropiada de HAD (SIADH, del inglés *syndrome of inapropriate antidiuretic hormone secretion*). Se produce en pacientes con traumatismos craneales, por ingesta de ciertas drogas que estimulan la liberación de HAD y en carcinomas de pulmón que secretan sustancias con actividad de HAD. En todos los casos hay un aumento del agua total del organismo y, aunque la cantidad total de Na^+ es normal, la dilución producida por el exceso de agua causa hiponatremia. Hay pasaje de agua hacia las células, las que aumentan su volumen y disminuyen su osmolaridad. Esto afecta el cerebro, produciendo cefaleas, nauseas y vómitos, cambios en el comportamiento, y se puede llegar a estupor y coma. En los casos de SIADH es típico encontrar que la orina es hiperosmótica en relación al plasma. El tratamiento consiste en la corrección del trastorno que ocasiona el desequilibrio hidroelectrolítico. Simultáneamente se deben suministrar soluciones salinas por vía endovenosa.

La *hiperhidratación hipertónica* se observa en individuos tratados con soluciones de osmolaridad elevada, en pacientes con síndrome de Cushing (aumento en la secreción de glucocorticoides), en el hiperaldosteronismo primario (exceso de aldosterona), o tratamientos crónicos con corticosteroides. Además de tratar la causa, se deben suministrar soluciones dextrosadas (5%) para corregirir la hiperosmolaridad. La administración de diuréticos que estimulan la natriuresis es importante para reducirir el exceso de Na^+.

Concentración de H^+ en los líquidos corporales

Normalmente la composición iónica del LEC varía muy poco gracias a la eficiencia de los mecanismos homeostáticos. Particularmente crítica para las funciones celulares es la concentración de iones hidrógeno, una de las constantes más rigurosamente controlada.

Con los alimentos ingresan, o se generan en el metabolismo, sustancias de carácter ácido o alcalino que tienden a desviar la concentración de iones hidrógeno de los líquidos corporales. Sin embargo, el pH del plasma sanguíneo se mantiene con gran constancia alrededor de 7,4[1], lo que corresponde a una concentración de H^+ de $0,4 \cdot 10^{-7}$ Eq/L, o $40 \cdot 10^{-6}$ mEq/L, o 40 nM (nanomolar) (Tabla 28-4). En condiciones normales sólo se producen ligerísimas modificaciones, dentro del rango de pH 7,35 a 7,45 (45 a 35 nM). Ello indica la existencia de un eficiente sistema de regulación, capaz de conservar el llamado *equilibrio ácido-base* y asegurar la constancia de la concentración de iones hidrógeno en líquidos corporales.

En relación con las concentraciones de los iones más abundantes del LEC la $[H^+]$ es muy pequeña. Sin embargo, los hidrogeniones tienen enorme importancia en los procesos biológicos. El organismo es muy sensible a los cambios de $[H^+]$; a tal punto, que valores por debajo de pH 7,0 ($1 \cdot 10^{-7}$ Eq/L, o $100 \cdot 10^{-6}$ mEq/L, o 100 nM), o por encima de pH 7,8 ($0,16 \cdot 10^{-7}$ Eq/L, o $16 \cdot 10^{-6}$ mEq/L, o 16 nM) son incompatibles con la vida.

El pH intracelular varía de un tejido a otro y aun entre distintas organelas de una misma célula; en general es ligeramente inferior al extracelular.

Como corrientemente se habla de equilibrio ácido-base, conviene aclarar algunos términos utilizados en clínica que no son estrictamente correctos desde el punto de vista químico.

Según el concepto de Bronsted y Lowry (ver pág. 14), *ácidos* son todos los compuestos o iones que ceden protones (H^+) y *bases* aquellos con capacidad para aceptar protones del medio. En clínica el uso ha impuesto designar ácidos a los aniones y bases a los cationes, lo cual, evidentemente, no se ajusta a la definición de Bronsted y Lowry.

Los aniones que mantienen su carga eléctrica o carácter iónico dentro de amplios límites de pH, por ejemplo SO_4^{2-}, Cl^-, se denominan *ácidos fijos* y deben ser necesariamente acompañados por cationes para mantener la electroneutralidad de los líquidos biológicos. Otros aniones procedentes de la ionización de electrólitos débiles captan fácilmente protones y pierden su estado ionizado cuando la concentración de hidrogeniones en el medio aumenta. Estos aniones integran sistemas *buffers* (HCO_3^-, HPO_4^{2-}, proteína$^-$, Hb^-). Los llamados *ácidos volátiles* se descomponen fácilmente y se eliminan por pulmón (ej.: ácido carbónico).

Los cationes son considerados *bases* en clínica. Los que existen en plasma mantienen su carga positiva dentro de amplios límites de pH y constituyen *bases fijas*.

[1] A la temperatura del organismo (37°C) el pH neutro es 6,7 ($2,1 \cdot 10^{-7}$ Eq/L); el plasma es ligeramente alcalino.

Para una mejor comprensión de los temas incluidos en esta sección se aconseja repasar los conceptos expuestos en el capítulo 2 (págs. 13 a 19).

Si bien el organismo tiene capacidad para neutralizar tanto ácidos como álcalis, en condiciones normales la actividad metabólica produce un exceso de productos ácidos. Un adulto con una dieta mixta genera alrededor de 20.000 mmoles de CO_2 por día. Este gas se disuelve en los líquidos corporales con formación de ácido carbónico ($CO_2 + H_2O \rightarrow H_2CO_3$).

La ionización de H_2CO_3 libera H^+. Normalmente el pulmón elimina todo el CO_2 producido (unos 300 litros por día); la gran cantidad de gas que transita por los líquidos corporales no deja equivalentes ácidos en el organismo.

Tabla 28-4. Relación entre pH y [H⁺] en el rango fisiológico.

pH	*[H⁺] nanomol/L o nanoEq/L*
7,8	16
7,7	20
7,6	26
7,5	32
7,4	40
7,3	50
7,2	63
7,1	80
7,0	100
6,9	125
6,8	160

El efecto neto de la metabolización de una dieta normal es la producción de 50 a 100 mEq de H^+ por día. Estos iones son derivados principalmente de la oxidación de aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) y catiónicos (arginina y lisina) y de los fosfatos contenidos en los alimentos como $H_2PO_4^-$. Pese a este exceso de ácidos el pH de los líquidos EC e IC no disminuye gracias a la eficacia de los sistemas de regulación.

Para hacer frente a la continua adición y remoción de ácidos y bases, el organismo cuenta con diversos dispositivos: a) los *sistemas buffers* existentes en los compartimientos intra- y extracelular. Constituyen un frente de acción inmediata contra los cambios en la concentración de H^+; b) mecanismos compensadores como la *ventilación pulmonar* y la *actividad de los túbulos renales*. La primera es de respuesta rápida y la segunda produce un ajuste más lento.

Regulación de la concentración de H^+

Sistemas amortiguadores. Los sistemas *buffers* existentes en el organismo generalmente están constituidos por un ácido débil y su sal. La acción amortiguadora no depende de un *buffer* en particular; es el resultado de la acción conjunta de todos los sistemas disponibles.

En el espacio intracelular los sistemas formados por proteínas ($Prot^-/HProt$) y fosfatos ($HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$) son los más importantes y representan una proporción considerable de la capacidad amortiguadora total del organismo.

En los líquidos extracelulares tienen especial interés los *buffers* de la sangre, primera línea de defensa contra fluctuaciones del pH; por otra parte, la sangre es el medio a través del cual la acumulación local de ácidos o bases es distribuida a todo el organismo.

El sistema de mayor interés fisiológico y clínico es el constituido por bicarbonato/ácido carbónico. Otro sistema de gran importancia es el de la hemoglobina en sus dos formas, oxigenada y desoxigenada ($HbO_2^-/HHbO_2$ y Hb^-/HHb). También actúan como *buffers* en el plasma las proteínas ($Prot^-/HProt$) y los fosfatos ($HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$), aunque su importancia relativa es mucho menor que la de los dos anteriores.

Proteínas-Hemoglobina. Las proteínas en general se comportan como sistemas *buffers* debido a la presencia en su molécula del grupo imidazol de la histidina, capaz de aceptar o ceder protones según el pH del medio (fig. 28-3); el pK_a del imidazol es 6,0.

Al pH de los líquidos biológicos, los grupos carboxílicos de los aminoácidos diácidos y los grupos amina libres de aminoácidos diaminados, están totalmente ionizados ($-COO^-$ y $-NH_3^+$). El grupo fenólico de tirosina y el sulfhidrilo de cisteína no manifiestan carga eléctrica porque sus pK_a están muy alejados del pH fisiológico. En consecuencia, el grupo imidazol de histidina es el único con capacidad para captar o ceder protones y otorga a las proteínas su papel amortiguador.

En sangre, oxihemoglobina y hemoglobina desoxigenada forman sistemas *buffer* ($HbO_2^-/HHbO_2$ y Hb^-/HHb); su papel es más importante que el de proteínas plasmáticas, no sólo por su mayor concentración (15 g/dL de Hb frente a 7 g/dL de proteínas plasmáticas), sino porque su conversión reversible $HbO_2 \rightleftharpoons Hb$ le permite influir sobre el sistema bicarbonato/ácido carbónico (ver más adelante).

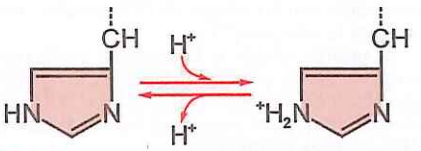


Fig. 28-3. Ionización del núcleo imidazol de la histidina.

Fosfatos. El ácido fosfórico (H_3PO_4) posee tres protones ionizables (ácido triprótico) que se liberan en reacciones sucesivas:

1) $H_3PO_4 \rightleftharpoons H_2PO_4^- + H^+ \quad pK_{a1} = 2,1$

2) $H_2PO_4^- \rightleftharpoons HPO_4^{2-} + H^+ \quad pK_{a2} = 6,8$ (a 37°C)

3) $HPO_4^{2-} \rightleftharpoons PO_4^{3-} + H^+ \quad pK_{a3} = 12,0$

El valor de pK_2 es el más próximo a 7,4, lo cual indica que a pH fisiológico las especies iónicas predominantes son HPO_4^{2-} y $H_2PO_4^-$ y prácticamente no existe ácido fosfórico no ionizado (H_3PO_4) ni ion PO_4^{3-}.

Según la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pK_a + \log \frac{[sal]}{[ácido]}$$

En el sistema *buffer* formado por HPO_4^{2-}/$H_2PO_4^-$ en plasma sanguíneo normal (pH 7,4):

$$pH = 6,8 + \log [HPO_4^{2-}] / [H_2PO_4^-]$$

de donde:

$$\log [HPO_4^{2-}] / [H_2PO_4^-] = 7,4 - 6,8 = 0,6$$

tomando antilogaritmo de ambos miembros:

$$[HPO_4^{2-}] / [H_2PO_4^-] = 4$$

Normalmente en el plasma existe una relación 4 a 1 entre $[HPO_4^{2-}]$ y $[H_2PO_4^-]$, lo cual indica que el sistema *buffer* de fosfatos del plasma es más eficaz para amortiguar ácidos que bases. Sin embargo, debido a las bajas concentraciones de fosfatos (la suma de ambos iones alcanza a 2 mEq/L), juegan un papel poco significativo en el plasma desde el punto de vista del equilibrio ácido-base.

Bicarbonato/ácido carbónico. El CO_2 formado como producto del metabolismo celular se disuelve en los líquidos corporales y en parte se hidrata para dar ácido carbónico, que se ioniza en bicarbonato e H^+:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

La concentración de H_2CO_3 está directamente relacionada con la cantidad de CO_2 disuelto, indicada con la notación $[CO_2]$.

Es posible modificar la ecuación de Henderson-Hasselbalch para el sistema HCO_3^-/H_2CO_3 reemplazando la variable $[H_2CO_3]$ por $[CO_2]$. El valor de pK para el sistema es 6,1. Entonces, al pH del plasma normal (7,4):

$$7,4 = 6,1 + \log [HCO_3^-] / [CO_2]$$

de donde:

$$\log [HCO_3^-] / [CO_2] = 7,4 - 6,1 = 1,3$$

tomando antilogaritmos de ambos miembros:

$$[HCO_3^-] / [CO_2] = 20$$

Este valor elevado para la relación [sal]/[ácido] indica que el sistema debe funcionar más eficientemente contra ácidos que ante excesos de álcalis.

La concentración normal de bicarbonato en plasma es alrededor de 25 mM y la de ácido carbónico, de 1,25 mM, la relación 25/1,25 = 20.

Como el pH resultante depende del valor de esta relación, las variaciones en concentración absoluta de bicarbonato y CO_2 no modificarán la concentración de hidrogeniones siempre que se mantenga el valor de 20 para el cociente $[HCO_3^-]/[CO_2]$.

Existe una íntima relación entre este sistema *buffer* y el transporte de CO_2 por la sangre, razón por la cual es aconsejable considerar aquí algunos aspectos del tema.

Transporte de dióxido de carbono

Un gas en contacto con un líquido se disuelve en cantidad proporcional a su constante de solubilidad y a la presión parcial del gas (ley de Henry). El dióxido de carbono, formado como resultado de la actividad celular, difunde a los líquidos corporales y se disuelve en ellos según la ley de Henry.

Las cantidades de CO_2 generadas en el organismo exceden la capacidad de la sangre para transportarlo físicamente disuelto. Sólo una pequeña fracción es vehiculizada en solución; el resto forma compuestos que fácilmente liberan el gas al llegar la sangre al pulmón.

La mayor parte del CO_2 transportado, alrededor del 90% del total, se encuentra como bicarbonato; más o menos 5% se combina con la hemoglobina formando carbamino y el resto está disuelto.

Carbamino. El dióxido de carbono puede ser transportado en combinación con los grupos α amina terminales de las cadenas de hemoglobina. Estos compuestos carbamino se forman espontáneamente en reacción reversible no enzimática:

$$Hb\text{-}NH_2 + CO_2 \rightleftharpoons Hb\text{-}NH\text{-}COO^- + H^+$$

La unión de CO_2 con hemoglobina es influida por el estado de oxigenación de ésta. En pulmón la formación de oxihemoglobina facilita la liberación

de CO_2, mientras que en los tejidos la desoxigenación de la hemoglobina favorece la fijación de CO_2 como carbamino. La interconversión $Hb \rightleftharpoons HbO_2$ también influye sobre la formación de bicarbonato en sangre. Esta acción tiene consecuencias similares a las mencionadas para la formación de carbamino: se favorece el desprendimiento de CO_2 en los pulmones y su captación en los tejidos. Este fenómeno, llamado *efecto Haldane*, parece ser la inversa del efecto Bohr (pág. 55).

Bicarbonato. El CO_2 que ingresa en la sangre se hidrata en los glóbulos rojos y forma ácido carbónico.

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$$

Esta reacción se produce espontáneamente, pero con gran lentitud. En sangre ocurre muy velozmente debido a la existencia en los eritrocitos de una enzima que la cataliza en ambos sentidos, la *anhidrasa carbónica*.

La cantidad de ácido carbónico formado es proporcional a la presión parcial del gas (Pco_2). El ácido se ioniza formando bicarbonato e H^+:

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

Esta reacción transcurre significativamente hacia la derecha si en el medio existen aceptores del ion hidrógeno y donantes de iones positivos para neutralizar el bicarbonato. En la sangre, la sustancia que más eficazmente realiza este intercambio es la hemoglobina.

La oxigenación de hemoglobina a oxihemoglobina la convierte en un ácido capaz de retener o neutralizar bases fijas. Dentro del glóbulo rojo, la base fija predominante es K^+ y la HbO_2 neutraliza mayor cantidad de iones K^+ que la hemoblobina desoxigenada. Cuando la HbO_2 cede su oxígeno, pierde algo de su carácter ácido y acepta iones hidrógeno procedentes de la disociación del ácido carbónico.

En la figura 28-4 se muestra la diferencia en la capacidad para neutralizar cationes entre HbO_2 y Hb. Dentro del rango de pH fisiológicos la oxihemoglobina fija cationes (bases) en mayor medida que la desoxihemoglobina. Por esta razón, cuando la HbO_2 entrega su oxígeno en los capilares tisulares deja en libertad bases utilizables para neutralizar el bicarbonato formado.

La hemoglobina juega así un papel muy importante en la formación de bicarbonato; la capacidad del plasma separado para transportar CO_2 como bicarbonato es mucho menor que la de sangre total.

Desplazamiento de cloruro. En los glóbulos rojos tiene lugar una serie de intercambios iónicos asociados al transporte de gases por la sangre. Estos intercambios están condicionados por la existencia de transportadores en la membrana plasmática. El desplazamiento de iones se realiza en direcciones opuestas según se consideren los eritrocitos en los capilares de alvéolos pulmonares o de otros tejidos.

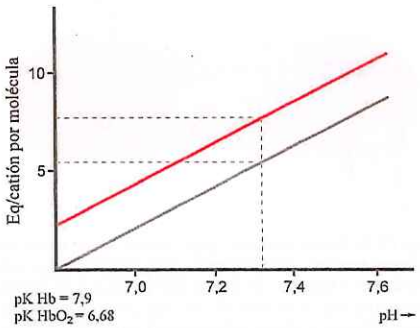


Fig. 28-4. Representación gráfica de la capacidad de la hemoglobina (línea gris) y de la oxihemoglobina (línea roja) para neutralizar cationes. En abscisas se indican valores de pH en el rango compatible con la vida de las células.

En tejidos. a) Cuando la sangre llega a los capilares periféricos, el CO_2 formado en las células como resultado de su actividad metabólica pasa al plasma y penetra en los eritrocitos, donde CO_2 y H_2O, en reacción catalizada por *anhidrasa carbónica*, forman H_2CO_3 que se ioniza en bicarbonato y H^+.

b) La oxihemoglobina que trae la sangre arterial se encuentra en los capilares tisulares ante una tensión de oxígeno relativamente baja, libera el O_2 que transporta, y se convierte en hemoglobina desoxigenada, relativamente menos ácida que la HbO_2.

c) La desoxigenación de oxihemoglobina deja en libertad parte de los cationes asociados a ella (principalmente K^+) y acepta protones (HHb) formados por la disociación del ácido carbónico. El bicarbonato es neutralizado por el K^+ cedido por la Hb.

d) Con la llegada de CO_2 a los eritrocitos aumenta la concentración de bicarbonato dentro de la célula, forzando su difusión hacia el plasma, donde su nivel es más bajo. Un intercambiador electroneutro HCO_3^-/Cl^- expulsa el bicarbonato e introduce Cl^- con una estequiometría 1:1. Este *antiporter* se encuentra en membrana plasmática de glóbulos rojos; es conocido como proteína *banda 3* (fig. 28-5).

En alvéolos pulmonares. Cuando la sangre regresa a los capilares de pulmón, tienen lugar des-

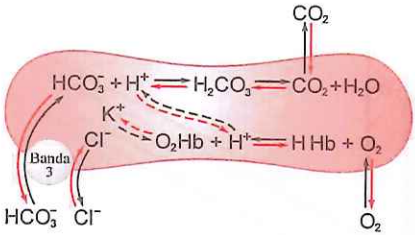


Fig. 28-5. Representación esquemática del intercambio de iones entre plasma y glóbulos rojos (desplazamiento de cloruros o fenómeno de Zuntz-Hamburger). Las flechas negras indican el sentido de las reacciones que ocurren en capilares de alvéolos pulmonares. Las flechas rojas corresponden a reacciones en los tejidos.

plazamientos en sentido opuesto a los descriptos en tejidos.

a) La mayor presión parcial de oxígeno en el alvéolo determina la conversión de hemoglobina desoxigenada en oxihemoglobina que, como es más ácida, libera protones y atrae cationes (K^+).

b) Los protones cedidos por la Hb son captados por iones HCO_3^- para reconstituir ácido carbónico. Por acción de anhidrasa carbónica, el H_2CO_3 se descompone en H_2O y CO_2. Este gas difunde hacia el plasma y es eliminado a través del epitelio alveolar.

c) Como consecuencia de las reacciones descriptas la concentración de bicarbonato en glóbulos rojos disminuye y cae por debajo de la del plasma. Esto determina la difusión de HCO_3^- desde el plasma hacia el interior de eritrocitos mediada por el intercambiador HCO_3^-/Cl^-.

Como consecuencia del desplazamiento de iones, los glóbulos rojos en sangre arterial poseen un contenido de cloruros más bajo que los eritrocitos de sangre venosa (fig. 28-5).

El conjunto de intercambios indicado arriba, llamado *fenómeno de Zuntz-Hamburger* o *ciclo de cloruros*, explica la mayor capacidad de transporte de CO_2 en forma de bicarbonato por el plasma en contacto con los glóbulos rojos (*plasma verdadero*), comparada con la de plasma solo (*plasma separado*).

El intercambio HCO_3^-/Cl^- permite al plasma disponer, indirectamente, de las bases intracelulares liberadas durante la conversión de HbO_2 en Hb.

***Buffers* del hueso.** El hueso tiene un importante papel amortiguador. Frente a una sobrecarga ácida puede haber liberación de Na^+ y K^+ de la superficie y disolución del mineral del hueso, que cede $NaHCO_3$ y $KHCO_3$ al comienzo y posteriormente $CaCO_3$ y $CaHPO_4$ al espacio EC. En general, la sobrecarga ácida aumenta la liberación de Ca^{2+} del hueso y la excreción urinaria del catión. En sobrecargas de bases el hueso aumenta la deposición de carbonato.

Sistemas de regulación

El bicarbonato, principal forma de transporte de CO_2 en sangre, es también componente del sistema *buffer* de mayor importancia funcional. El pH de la sangre es regulado mediante ajustes en la relación [bicarbonato]/[ácido carbónico]. Ambos términos de esta relación pueden ser modificados independientemente: a) el *aparato respiratorio* es capaz de modificar la Pco_2 y, con ello, la concentración de ácido carbónico en plasma; b) el *riñón*, por su parte, es el encargado de modular la concentración de bicarbonato.

Regulación respiratoria

El centro respiratorio en el bulbo es sensible a cambios de pH y Pco_2 de la sangre que lo irriga. La disminución del pH o el aumento de Pco_2 provocan como respuesta incremento de la frecuencia y profundidad de los movimientos respiratorios; se intensifica el intercambio de gases y la eliminación de CO_2. Por el contrario, la caída de Pco_2 o la elevación del pH determinan reducción de la frecuencia y amplitud de la respiración, con la consiguiente acumulación de CO_2 en la sangre.

Cuando ocurren alteraciones en el pH de los líquidos corporales, la actividad respiratoria interviene como factor normalizador, modificando el valor del denominador de la relación [bicarbonato]/[CO_2].

Según la ecuación de Henderson-Hasselbalch, el pH es 7,4 cuando la relación $[HCO_3^-]/[CO_2]$ es igual a 20, independientemente de los valores absolutos de cada uno de los términos de la relación.

Un exceso de ácidos en sangre produce disminución de la concentración de bicarbonato y, con ello, reducción del pH. En tal caso, el aparato respiratorio procura mantener la relación $[HCO_3^-]/[CO_2] = 20$, aumentando la ventilación pulmonar. De este modo disminuye la Pco_2 en sangre y, por consiguiente, la concentración de ácido carbónico en plasma. Si, en cambio, hay exceso de álcalis, la relación $[HCO_3^-]/[CO_2]$ se altera por aumento del numerador. En este caso, el aparato respiratorio tiende a restablecer el equilibrio disminuyendo la ventilación, lo cual aumenta la Pco_2 en sangre y, por ende, la concentración de ácido carbónico.

La respuesta respiratoria a los trastornos ácido-base es rápida: comienza en minutos y alcanza su compensación máxima dentro de las 12 horas.

Regulación renal

Las transformaciones metabólicas de los alimentos de una dieta normal producen entre 50 y 100 mEq de ácido no carbónico por día. Este exceso de ácido se elimina por vía renal. Los riñones mantienen el equilibrio ácido-base, fundamentalmente por su capacidad de regular la excreción de H^+ y de reabsorber el bicarbonato filtrado en los glomérulos.

El CO_2 que difunde desde la sangre o es producido en las mismas células tubulares, se hidrata para formar ácido carbónico, en reacción catalizada por *anhidrasa carbónica*. De inmediato, el H_2CO_3 se ioniza en H^+ y bicarbonato:

$$CO_2 + H_2O \underset{\text{Anhidrasa carbónica}}{\rightleftharpoons} H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

Los iones H^+ son secretados desde el interior de la célula hacia la luz tubular a través de mecanismos de transporte que operan en las porciones proximales y distales del nefrón. En la membrana apical de los túbulos proximales funciona el intercambiador o *antiporter* Na^+/H^+ que envía H^+ desde el interior de la célula hacia el lumen en intercambio con iones Na^+ que ingresan a favor del gradiente creado por acción de la Na^+,K^+-ATPasa. Se trata de un transporte activo secundario electroneutro; la relación $Na^+:H^+$ es 1:1. El Na^+ dentro de la célula es bombeado por la Na^+,K^+-ATPasa hacia el espacio intersticial peritubular, desde donde pasa a la sangre. Por su parte, los iones bicarbonato producidos por ionización del H_2CO_3 difunden hacia la sangre por un cotransportador Na^+/HCO_3^- (fig. 28-6).

A diferencia de los túbulos proximales, en las células de los túbulos distales y conductos colectores renales, la secreción de H^+ hacia la luz es impulsada por una bomba de protones (H^+-ATPasa) y otra que intercambia H^+ por K^+ (H^+,K^+-ATPasa), ambas en la membrana luminal. El bicarbonato vuelve a la circulación por un intercambiador Cl^-/HCO_3^- de membrana basolateral. El Cl^- ingresa a la célula favorecido por su gradiente.

Estos mecanismos básicos de secreción de H^+ hacia la luz tubular están asociados a tres procesos que el riñón pone en marcha para contrarrestar excesos de ácidos: a) reabsorción de bicarbonato, b) acidificación de la orina y c) producción de iones amonio.

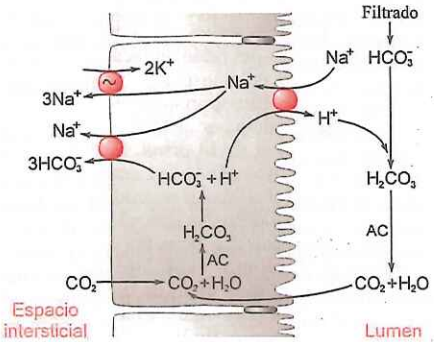


Fig. 28-6. Representación esquemática del proceso de reabsorción de bicarbonato en células de los túbulos proximales del nefrón. AC: anhidrasa carbónica.

a) **Reabsorción de bicarbonato.** El bicarbonato es un ion con umbral renal. Cuando su nivel en plasma excede 28 mEq/L aparece bicarbonato en orina. Si la concentración del ion es de 27 mEq/L o menos, los túbulos renales reabsorben todo el bicarbonato filtrado y no se elimina por orina, siempre que la $[CO_2]$ se mantenga en sus límites normales, ya que si ésta disminuye, el riñón eliminará HCO_3^- aun cuando su nivel en plasma sea menor de 28 mEq/L. En ese caso, predomina la exigencia de mantener en 20 el valor de la relación $[HCO_3^-]/[CO_2]$.

La tasa de reabsorción de bicarbonato difiere según el nivel del nefrón que se considere. Esta se realiza predominantemente en el túbulo contorneado proximal donde alcanza una magnitud importante. Una persona normal con una tasa de filtración glomerular de 180 L/día y una concentración de HCO_3^- en plasma de 24 mEq/L debe reabsorber aproximadamente 4.300 mEq de bicarbonato por día. El 90% de esta reabsorción se realiza en los túbulos proximales.

El bicarbonato contenido en el filtrado se combina con el H^+ para dar ácido carbónico, que es descompuesto en CO_2 y H_2O por la anhidrasa carbónica del borde en cepillo de membrana apical. El CO_2 penetra fácilmente en la célula tubular donde se hidrata en reacción catalizada por la anhidrasa carbónica del citosol. El ácido carbónico formado produce H^+ y HCO_3^-. Como se mencionó, los H^+ son secretados hacia el lumen por el antiporter Na^+/H^+ y las bombas de protones según el túbulo renal sea proximal o distal. Por su parte, el bicarbonato retorna a la circulación, principalmente a través del cotransportador $Na^+/3HCO_3^-$ de la membrana basolateral (fig. 28-6). El funcionamiento del *symporter* electrogénico $Na^+/3HCO_3^-$ depende

del gradiente eléctrico generado por la Na^+,K^+-ATPasa (transporte activo secundario). En los segmentos distales del riñón, el bicarbonato no se reabsorbe a través del transportador $Na^+/3HCO_3^-$, sino por un contratransportador que intercambia Cl^- desde el intersticio por $3HCO_3^-$.

b) **Acidificación de la orina.** El riñón puede elaborar orinas cuyos pH varían entre valores extremos de 4,5 y 7,9 según las necesidades del organismo. El filtrado glomerular tiene el pH del plasma sanguíneo; a medida que fluye por los túbulos es modificado hasta alcanzar el pH final de la orina.

El simple cambio en el pH de la orina es totalmente insuficiente para compensar el ingreso de ácido en el organismo. En un litro y medio, volumen de orina normalmente eliminado por día, aun al pH más bajo (4,5), la cantidad total de H^+ libre que puede excretarse es 0,00006 mEq. La capacidad reguladora del riñón depende de otros mecanismos.

La posibilidad de eliminar ácidos libres (no ionizados) está relacionada con su pK_a. Cuando éste es igual al pH, la mitad del ácido está ionizada (ecuación de Henderson-Hasselbalch). Cuando el pK_a es una unidad mayor que el pH de la orina, 9/10 partes del ácido están no ionizadas y sólo 1/10 debe ser neutralizado por bases.

Cuando se trata de radicales de ácidos fuertes, como Cl^- o SO_4^{2-}, necesariamente deben ser acompañados por bases, pues siguen ionizados aun a los pH más bajos que alcanza la orina.

En los glomérulos filtran varios ácidos débiles que forman sistemas amortiguadores en la orina. Gracias a su pK_a (6,8) y a su tasa de excreción relativamente alta, el principal sistema *buffer* urinario es el $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$. Las siguientes cifras dan una idea de su importancia: al pH normal del plasma (7,4) la relación $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$ es 4:1. Si consideramos una eliminación de 50 milimoles de fosfatos en el filtrado, 40 se encuentran como HPO_4^{2-} y 10 como $H_2PO_4^-$; si el pH del líquido tubular desciende a 6,8, la relación $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$ cae a 1:1 y a pH 4,8, prácticamente todo se encuentra como $H_2PO_4^-$. Es decir, el *buffer* de fosfatos puede excretar alrededor de 40 mEq de H^+.

La presencia de anhidrasa carbónica en las células tubulares es esencial en el proceso de acidifícación, pues gracias a su acción se genera H_2CO_3 y con él los iones H^+. Por cada H^+ eliminado retorna a la sangre un ion HCO_3^- (fig. 28-7).

La magnitud de la acidificación producida por el riñón se determina por titulación de la orina con un álcali hasta llevar su pH al valor del plasma. La cantidad de álcali empleado corresponde a la *acidez titulable de la orina*, y resulta un índice útil para apreciar la contribución renal al

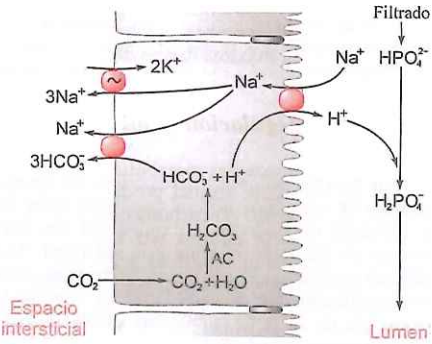


Fig. 28-7. Representación esquemática del proceso de acidificación de la orina en túbulos renales. AC: anhidrasa carbónica.

equilibrio ácido-base. La acidez titulable es debida principalmente a la amortiguación del H^+ por HPO_4^{2-} del filtrado y, en mucho menor extensión, por otros *buffers* como creatinina ($pK_a = 4,97$) y ácido úrico ($pK_a = 5,75$). Una excreción significativa de H^+ ocurre en la cetoacidosis diabética, en la cual se eliminan cantidades importantes de ácido β-hidroxibutírico. Este ácido actúa como *buffer* urinario. A un pH de 4,8, la mitad capta protones y se encuentra no ionizada.

c) **Producción de amoníaco.** La capacidad de excretar H^+ con los fosfatos es limitada. A fin de contrarrestar sobrecargas de ácido, el riñón dispone aún de otro recurso: la secreción de amoníaco.

La génesis de amoníaco en el túbulo renal se realiza principalmente a partir de glutamina por acción de *glutaminasa*. Esta enzima es abundante en células de los túbulos proximales, distales y colectores. La unión amida de la glutamina es hidrolizada con producción de amoníaco y glutamato. También se forma amoníaco por desaminación de aminoácidos, particularmente glutamato, en reacción catalizada por *glutamato deshidrogenasa*. De esta manera, una molécula de glutamina genera dos de amoníaco; primero la glutaminasa la hidroliza a glutamato y después la glutamato deshidrogenasa la convierte en α-cetoglutarato. La metabolización del α-cetoglutarato en el ciclo de ácido cítrico genera dos moléculas de CO_2.

El NH_3, molécula polar pequeña, difunde libremente a través de membranas y puede pasar a la luz tubular donde forma amonio al unirse a H^+ secretado por el *antiporter* Na^+/H^+. Las membranas son impermeables al ion NH_4^+; éste no puede regresar a la célula.

Sólo una parte del NH_3 generado en los túbulos proximales pasa como tal al lumen; una pro-

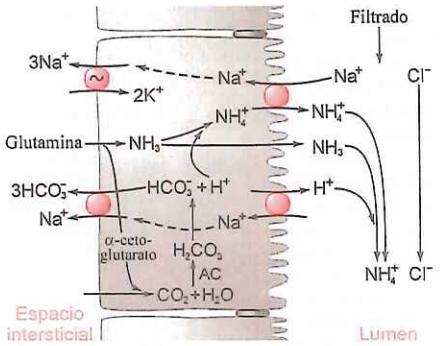


Fig. 28-8. Representación esquemática del proceso de formación de iones amonio en túbulos proximales del nefrón. AC: anhidrasa carbónica.

porción importante se convierte en ion amonio dentro de la célula. El protón procede de la ionización del H_2CO_3 formado por acción de anhidrasa carbónica. El HCO_3^- restante pasa a la circulación por el cotransportador $Na^+/3HCO_3^-$ en la membrana basolateral. El ion amonio es excretado hacia el lumen por el intercambiador Na^+/H^+ de membrana apical, que funciona también como *antiporter* Na^+/NH_4^+ (fig. 28-8).

La excreción de iones H^+ como amonio es un mecanismo muy importante en la regulación renal del equilibrio ácido-base, ya que la tasa de producción de NH_4^+ puede ser ajustada a las necesidades. La suma de la acidez titulable más el amonio liberado hacia la luz, menos el bicarbonato existente en orina, constituyen la *excreción neta de ácido*, buen índice de la contribución total del riñón en el proceso de regulación de la $[H^+]$ frente a excesos de ácidos en el organismo.

Los mecanismos renales de compensación son más lentos que los respiratorios; recién después de 2 días alcanzan el máximo de su capacidad. Con todo, el riñón es el más eficiente de los órganos de regulación.

Regulación del pH intracelular

En contraste con la uniformidad del pH en el espacio EC, el IC muestra heterogeneidad entre distintos tipos celulares. En músculo esquelético varía entre 6,9 y 7,2; en cerebro es de 7,1; en hígado, 7,2. Aún más notables pueden ser las diferencias entre organelas en una misma célula; el pH en el interior de lisosomas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y mitocondrias presenta distintos valores.

La viabilidad y funcionalismo de las células son altamente dependientes del pH y exigen estrictos mecanismos de control. La gran mayoría de las células regulan la concentración citoplásmica de H^+ principalmente gracias a los sistemas de transporte de protones en sus membranas. Mencionaremos los más importantes.

Contratransporte Na^+/H^+. Se encuentra en la membrana plasmática. En células epiteliales ha sido demostrado tanto en la membrana apical como en la basolateral. La estequiometría Na^+:H^+ es 1:1, es decir, su funcionamiento es electroneutro. Es impulsado por el gradiente transmembrana de Na^+ creado por la bomba de sodio.

Intercambiador HCO_3^-/Cl^- no dependiente de Na^+. Es un *antiporter* electroneutro; la relación HCO_3^-:Cl^- es 1:1. Depende de los gradientes de Cl^- y HCO_3^-, de modo que el sentido del flujo puede revertirse si se modifican los gradientes. El intercambiador de este tipo más estudiado es el de eritrocitos, identificado con la proteína *banda 3*, que desempeña un papel importante en el transporte de CO_2 y regulación del pH del plasma.

Intercambiador HCO_3^-/Cl^- dependiente de Na^+. Presente en muchas células de mamíferos. Introduce HCO_3^- y Na^+ en la célula y expulsa H^+ y Cl^- con una estequiometría 1:1:1:1; por lo tanto, es electroneutro. Es importante en la normalización del pH intracelular después de una sobrecarga ácida. Su funcionamiento depende del gradiente de Na^+ creado por la Na^+,K^+-ATPasa.

Intercambiador Na^+/HCO_3^-. Presente en la membrana basolateral de células proximales del riñón. Como transporta tres HCO_3^- por cada Na^+ es electrogénico. Es uno de los mecanismos de reabsorción de bicarbonato en riñón.

ATPasas de protones. Son bombas que acoplan directamente la hidrólisis de ATP al transporte de H^+. Algunas son electroneutras y otras electrogénicas. En la membrana plasmática se encuentran dos clases de ATPasas que transportan protones; la H^+,K^+-ATPasa se expresa en la membrana apical de células parietales de la mucosa gástrica. Realiza el intercambio electroneutro de 2 iones H^+ que acidifican el lumen gástrico, por cada 2 iones K^+ que se movilizan dentro de la célula. La H^+,K^+-ATPasa está localizada también en epitelio intestinal y renal. La H^+-ATPasa se encuentra en membranas apicales de células de segmentos distales del nefrón. Como se mencionó, este transportador y la H^+,K^+-ATPasa contribuyen a acidificar la orina. En organelas subcelulares (endosomas, lisosomas, mitocondrias y Golgi) existen bombas electrogénicas. Por su estructura se clasifican como ATPasas V (ver pág. 216). Las de lisosomas, endosomas y aparato de

Golgi acidifican el lumen. El bombeo de protones acoplado al transporte de electrones en mitocondrias alcaliniza la matriz.

Trastornos del equilibrio ácido-base

Las alteraciones del equilibrio ácido-base se reflejan en la sangre, razón por la cual los trastornos clínicos se definen según las desviaciones observadas en el plasma. Se habla de *acidemia* cuando el pH de la sangre es menor de 7,35 ($[H^+]$ = 45 nM). Las condiciones que causan acidemia se engloban con el término *acidosis*. La *alcalemia* es el aumento del pH sanguíneo por encima de 7,45 ($[H^+]$ = 35 nM) y es producida por estados de *alcalosis*.

Clínicamente, el sistema *buffer* bicarbonato/ácido carbónico es un índice muy valioso para evaluar el estado ácido-base de la sangre. Lógicamente, los trastornos del equilibrio afectan por igual a todos los sistemas amortiguadores de la sangre, pero el constituido por HCO_3^-/CO_2 puede ser más fácilmente determinado. Por otra parte, los órganos regulatorios actúan directamente sobre uno u otro término del par *buffer*: el aparato respiratorio ajusta la $[CO_2]$, mientras el riñón modula la $[HCO_3^-]$.

Según cuál sea la modificación primaria en los componentes del *buffer* bicarbonato/ácido carbónico, los trastornos del equilibrio ácido-base se distinguen en cuatro grupos principales: 1) acidosis respiratoria, 2) acidosis metabólica, 3) alcalosis respiratoria y 4) alcalosis metabólica.

1. **Acidosis respiratoria**. Por reducción primaria de la eliminación de CO_2 a nivel de pulmón, se produce aumento de la tensión parcial de CO_2 (Pco_2). Hay incremento de la concentración de ácido carbónico, con disminución del pH sanguíneo, lo cual configura un cuadro de *acidosis descompensada*.

A esta situación se llega por condiciones patológicas en las que existen perturbaciones de la ventilación pulmonar, con reducción del intercambio de gases: a) hipoventilación por depresión del centro respiratorio (por drogas u otros agentes), b) insuficiencia respiratoria por afecciones pulmonares (enfisema, asma bronquial, neumonía u otros procesos que perturban la ventilación de zonas extensas del pulmón), c) insuficiencias circulatorias que disminuyen el flujo sanguíneo en pulmón y retardan el intercambio gaseoso.

A fin de compensar el desequilibrio, en estos casos el riñón aumentará la reabsorción de bicarbonato y la secreción urinaria de ácido (H^+) y amoníaco (aumento de acidez titulable y de la excreción ácida neta por orina). Estas acciones incrementan la concentración de bicarbonato en plasma, tendiendo a restablecer el valor normal de la relación $[HCO_3^-]/[CO_2]$. Si este valor vuelve a 20 (pH = 7,4) se dice que la acidosis es *compensada*.

2. **Acidosis metabólica**. Hay descenso primario de bicarbonato en plasma por pérdida exagerada de ese ion o aumento en la producción, retención o ingesta de ácidos. La reducción de $[HCO_3^-]$ resulta en disminución del pH en sangre (*acidosis descompensada*).

Este tipo de alteración se produce en diabetes no controladas, inanición y otras situaciones en las cuales hay producción aumentada de cuerpos cetónicos (acetoacetato, β-hidroxibutirato); en diarreas profusas con pérdidas de jugos digestivos ricos en bicarbonato; en insuficiencias renales en las cuales los mecanismos tubulares de secreción de H^+ no funcionan adecuadamente.

La respuesta compensadora inmediata en este tipo de alteración es la estimulación del centro respiratorio con aumento de la ventilación pulmonar, que tiende a disminuir la Pco_2 y, con ello, la $[CO_2]$. Excepto en los casos de insuficiencia tubular, la respuesta del riñón es incremento de la eliminación de ácido y amoníaco (aumento de acidez titulable y excreción neta de ácido por orina). Si la reducción de $[CO_2]$ es suficiente para llevar el pH a sus valores normales, la acidosis será *compensada*.

3. **Alcalosis respiratoria**. Se produce por descenso primario de la Pco_2. Ocurre en la hiperventilación pulmonar provocada por: a) estimulación exagerada del centro respiratorio en procesos patológicos del sistema nervioso central (encefalitis), b) hipoxia acentuada, c) intoxicación por salicilatos, d) pacientes ansiosos o histéricos. La disminución de la $[H_2CO_3]$ produce aumento del pH (*alcalosis descompensada*). La compensación comprende mayor excreción de bicarbonato y reducción de amoníaco en orina (disminución de acidez titulable y de excreción neta de ácido).

4. **Alcalosis metabólica**. Aumento primario de bicarbonato que produce elevación del pH sanguíneo (*alcalosis descompensada*). Puede producirse por ingestión exagerada de álcalis ($NaHCO_3$) y también por eliminación excesiva de ácidos del organismo. El ejemplo más común es el de los vómitos incoercibles (ej.: obstrucción pilórica) en los cuales se pierde jugo gástrico, rico en ácido clorhídrico.

Los mecanismos de compensación son, por parte del aparato respiratorio, depresión de la ventilación a fin de disminuir la eliminación de

CO_2 y aumentar la $[H_2CO_3]$. El riñón reduce la reabsorción de bicarbonato y la formación de amoníaco (disminuye la excreción neta de ácido). Si se logra restaurar el pH de la sangre a su valor normal, la alcalosis es *compensada*.

Factores que regulan la excreción de H^+

La acidosis de cualquier tipo produce disminución del pH en las células tubulares del nefrón y aumenta el gradiente de $[H^+]$ a través de la membrana apical. Esto facilita la secreción de protones hacia el lumen. En la alcalosis, el gradiente se reduce y la secreción de H^+ es deprimida. El aumento de la $[H^+]$ en el citoplasma, o de la Pco_2, además de incrementar el gradiente que impulsa el transporte, promueve la inserción de unidades adicionales de transportadores en la membrana apical, estimulando la excreción de protones. Los cambios de pH modifican la expresión y actividad de los mecanismos de transporte de H^+ y HCO_3^-. El número de intercambiadores Na^+/H^+ en membrana luminal de los túbulos proximales y de "bombas" H^+-ATPasa en conductos colectores aumenta en la acidosis. El transporte de protones hacia el lumen eleva su concentración en el líquido tubular e hiperpolariza la membrana apical, lo cual tendería a reducir el funcionamiento de los transportadores. El gradiente limitante en el tubo colector se alcanza cuando el pH del líquido llega a 4,5.

Los *buffers* presentes en el fluido tubular eliminan los protones secretados tratando de mantener una $[H^+]$ baja (pH alto), sostener el gradiente y favorecer la secreción de protones.

La concentración de bicarbonato en el filtrado glomerular depende de la existente en el plasma. Los factores que alteran la $[HCO_3^-]$ en el líquido tubular modifican la secreción de protones y con ello la magnitud de la reabsorción o excreción de bicarbonato.

En general, los factores que regulan el volumen del líquido extracelular y el balance de sodio (sistema renina-angiotensina-aldosterona) también afectan la excreción de H^+. Por ejemplo, cuando la angiotensina II aumenta la actividad del intercambiador Na^+/H^+ en los tubos proximales, o la aldosterona estimula la reabsorción de Na^+ en los conductos colectores, promueven la secreción de H^+.

El balance de K^+ también está relacionado con los movimientos de H^+ y de NH_4^+ en los túbulos proximales. La secreción de H^+ y la de NH_4^+ se reducen en la hipercaliemia (hiperpotasemia) y aumentan en la hipocaliemia.

La producción de NH_4^+ es estimulada cuando el pH celular se reduce. Esto incluye la inducción de la síntesis de las enzimas comprometidas en el metabolismo de la glutamina. En alcalosis, la producción de NH_4^+ se inhibe.

Estudios de laboratorio en los trastornos del equilibrio ácido-base

La determinación del pH del plasma permite el diagnóstico de acidosis o alcalosis descompensadas, pero nada dice acerca del trastorno primario que caracteriza la alteración dentro de las cuatro categorías descriptas. Por otro lado, en situaciones compensadas el pH es normal y no aporta elementos para la evaluación del desequilibrio.

Los trastornos ácido-base se reflejan en los valores absolutos de los términos del sistema bicarbonato/CO_2; de allí el interés clínico de este amortiguador.

Según la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

$$pH = 6{,}1 + \log [HCO_3^-] / [CO_2] \quad (1)$$

De las tres variables de la ecuación, dos (pH y $[CO_2]$) se pueden medir directamente. El pH y la Pco_2 se determinan por métodos potenciométricos. El valor de $[CO_2]$ en milimoles por litro se obtiene del producto de Pco_2 (en mm Hg) por el coeficiente de solubilidad del CO_2 en el plasma ($\alpha = 0{,}0301$ mM/L/mm Hg):

$$[CO_2] = \alpha \cdot Pco_2 = 0{,}0301 \cdot Pco_2 \quad (2)$$

Conociendo dos variables, se puede calcular la tercera, en este caso $[HCO_3^-]$:

$$[HCO_3^-] = (0{,}0301 \cdot Pco_2) \cdot \text{antilog}\ (pH - 6{,}1)$$

Existen métodos volumétricos, poco utilizados actualmente, que permiten medir la cantidad de CO_2 total en plasma. El CO_2 total representa la suma del CO_2 disuelto físicamente y el bicarbonato:

$$CO_2 \text{ total} = [HCO_3^-] + [CO_2]$$

de donde:

$$[HCO_3^-] = CO_2 \text{ total} - [CO_2]$$

sustituyendo el valor de $[CO_2]$ (2):

$$[HCO_3^-] = CO_2 \text{ total} - (0{,}0301 \cdot Pco_2)$$

y reemplazando en la ecuación (1) se tiene:

$$pH = 6{,}1 + \log \frac{CO_2 \text{ total} - (0{,}0301 \cdot Pco_2)}{(0.0301 \cdot Pco_2)}$$

Existen nomogramas con los cuales se obtiene directamente el valor de la variable restante a partir de dos de ellas. Debe tenerse en cuenta que la realidad clínica suele ser compleja. Los mecanismos de compensación y anomalías adicionales ajenas a la causa primaria complican a veces la interpretación de muchos cuadros patológicos.

Otro parámetro utilizado para evaluar el componente metabólico ($[HCO_3^-]$) es el llamado *exceso de base*. Se calcula a partir de los valores de pH, Pco_2 y concentración de hemoglobina, aplicando una ecuación desarrollada por Siggaard-Andersen. Se han construido nomogramas con los cuales se obtiene directamente el valor del exceso de base con los datos arriba mencionados.

El exceso de base tiene valor 0 en condiciones normales (pH 7,4, Pco_2 40 mm Hg, Hb 15 g/dL, 37° C). El incremento de bicarbonato da un exceso de base positivo, mientras su disminución da un "exceso de base negativo", que en realidad indica déficit de base. En la acidosis metabólica hay exceso de base negativo y en la alcalosis metabólica el exceso de base es positivo. En los trastornos respiratorios, inicialmente el exceso de base es 0.

El conocimiento del valor del exceso de base es útil como guía en el tratamiento de pacientes con trastornos ácido-base. Debe tenerse en cuenta que, como los procesos reguladores modifican los valores en los cuales se basa la estimación, es necesario realizar determinaciones seriadas para tener una idea más aproximada del estado del paciente en un momento dado.

Para un diagnóstico correcto es necesario determinar, además de pH y CO_2 total, la concentración de aniones y cationes en plasma. Comúnmente se miden las concentraciones de Na^+, K^+ y Cl^-. Los restantes aniones (sulfatos, fosfatos, proteínas) y cationes (Ca^{2+}, Mg^{2+}) no son medidos en los estudios de rutina, sino estimados indirectamente.

Como los líquidos biológicos siempre mantienen la neutralidad eléctrica, la suma de cargas positivas y la de negativas en plasma deben ser iguales ([cationes] = [aniones]), aunque individualmente la concentración de alguno de ellos varíe.

El Na^+ y el K^+ del plasma representan alrededor del 95% del total de cationes, mientras Cl^- y HCO_3^- componen el 85% del total de aniones. El resto de cargas negativas, alrededor del 15% del total, corresponde principalmente a fosfatos, sulfatos y proteínas. La concentración de estos aniones puede ser estimada por diferencia:

$$\text{Aniones restantes} = ([Na^+] + [K^+]) - ([Cl^-] + [HCO_3^-])$$

El valor normal de aniones restantes (en inglés *anion gap*: brecha de aniones) oscila entre 10 y 15 mEq/L. Su nivel está aumentado en las acidosis metabólicas (ej.: acidosis láctica).

RESUMEN

Balance del agua. El agua constituye aproximadamente 60% de la masa corporal en el varón adulto, 60% en la mujer y 77% en el lactante. Esta masa de agua está distribuida en un compartimiento intracelular (IC) y otro extracelular (EC). El líquido extracelular (LEC) constituye el llamado *medio interno*. En el hombre adulto, 45% del peso corresponde al agua intracelular y 15% al LEC, del cual 10% es líquido intersticial y 5% intravascular. Ingresan por día unos 2.500 mL de agua (1.400 mL con los líquidos de bebida, 800 mL formando parte de alimentos sólidos y 300 mL generados por el metabolismo) y egresan 1.500 mL por orina, 150 mL con las materias fecales y 850 mL por piel y pulmones. El Na^+ es el principal catión extracelular y el K^+ lo es del espacio intracelular. Entre los aniones, el Cl^- predomina en el LEC y los fosfatos, sulfatos y proteinatos en el LIC. *Equilibrio Gibbs-Donnan.* La presencia de proteínas (aniones al pH de los líquidos biológicos) confinadas en espacios cerrados por membranas semipermeables determinan una distribución desigual de los iones difusibles: a) la concentración total de aniones es igual que la de cationes en cada lado de la membrana; b) en el compartimiento con proteínas, la concentración de aniones difusibles es menor y la de cationes es mayor que en el carente de proteínas; c) la presión osmótica en el sector con proteínas es ligeramente superior. *Osmolaridad de los líquidos corporales.* El plasma tiene unos 300 miliosmoles por litro, que corresponden fundamentalmente a los electrólitos de pequeña masa molecular. El Na^+ y el K^+ son cationes importantes; su movimiento a través de membranas es condicionado por sistemas de transporte activo (Na,K-ATPasa). La regulación de la osmolaridad del LEC depende principalmente de la actividad renal, regulada por las hormonas antidiurética, aldosterona y péptido natriurético atrial. La sed condiciona la ingesta de líquido. Los cuadros de deshidratación e hiperhidratación pueden ser isotónicos o acompañarse de cambios en la osmolaridad (hipotónicos o hipertónicos). *Presión oncótica.* Desarrollada por las proteínas, es un factor regulador del intercambio de líquido entre la sangre y

el espacio intersticial. El equilibrio de la filtración a través de la pared de los capilares con el gradiente de presiones oncóticas contribuye al mantenimiento del volumen de líquido circulante.

Equilibrio ácido-base. Para hacer frente a la continua adición y remoción de ácidos y bases, el organismo cuenta con: A) sistemas *buffers* y B) mecanismos compensadores que actúan modificando la ventilación pulmonar o la actividad de los túbulos renales. a) *Sistemas amortiguadores*. En el espacio intracelular están representados por proteínas ($Prot^-$/Prot) y fosfatos ($HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$). En el LEC las proteínas de la sangre, especialmente Hb, actúan como *buffers* (los grupos imidazol de histidinas captan o ceden H^+, pues su pK_a es próximo al pH de los líquidos biológicos). Los fosfatos tienen poca importancia en el LEC. El sistema de mayor interés es el de bicarbonato/ácido carbónico. El CO_2 formado por la actividad celular se disuelve en los líquidos corporales y se hidrata en reacción catalizada por la *anhidrasa carbónica* para dar ácido carbónico, que se ioniza en bicarbonato e H^+. La concentración de H_2CO_3 depende de la cantidad de CO_2 disuelta y ésta de la Pco_2. Por esta razón se puede hablar de sistema HCO_3^-/CO_2 cuyo pK_a es 6,1. Al pH normal (7,4), la relación $[HCO_3^-]/[CO_2]$ tiene un valor de 20. La mayor parte del CO_2 (alrededor del 90%) se transporta en la sangre como bicarbonato, un 5% como carbamino de Hb y el resto disuelto físicamente. La sangre total, debido a la presencia de Hb, tiene mayor capacidad para transportar CO_2 que el plasma separado. La HbO_2 es un ácido relativamente más fuerte que la Hb. Esto ocasiona cambios iónicos asociados al transporte de gases (fenómeno de Zuntz-Hamburger). *Regulación*. Ambos componenes del sistema HCO_3^-/CO_2 pueden ser regulados. *Regulación respiratoria*: el centro respiratorio es sensible a cambios de pH y de Pco_2 de la sangre. Como respuesta a la caída en el pH o al aumento de Pco_2 se produce incremento en la frecuencia y profundidad de los movimientos respiratorios, intensificando la eliminación de CO_2. Una reducción de Pco_2 o aumento de pH deprime la ventilación pulmonar y favorece la acumulación de CO_2 en la sangre. Se procura así mantener el pH próximo a su valor normal, tratando que la relación $[HCO_3^-]/[CO_2]$ se acerque a 20. La respuesta compensadora del aparato respiratorio es rápida (en 12 a 24 horas alcanza su máximo). *Regulación renal*: el riñón pone en marcha tres mecanismos para contrarrestar el exceso de ácidos; a) reabsorción de bicarbonato, b) acidificación de la orina, c) producción de iones amonio. La *acidez titulable* más la cantidad de amonio, menos la de bicarbonato en orina, dan la *excreción neta de ácidos* y sirve de índice de la contribución del riñón a la regulación de la concentración de $[H^+]$ frente a excesos de ácidos. Los cambios de pH en las células de los túbulos modifican la actividad y expresión de los mecanismos de transporte de H^+ y HCO_3^-. El aumento de la secreción de H^+ incrementa la reabsorción de HCO_3^- y la excreción de ácido. La compensación renal es más lenta que la respiratoria ya que alcanza el máximo de su capacidad después de 2 o 4 días. *Trastornos del equilibrio ácido-base*. Según cuál sea la modificación primaria de los componentes del sistema HCO_3^-/CO_2 se distinguen cuatro tipos de alteraciones: 1) acidosis respiratoria, 2) acidosis metabólica, 3) alcalosis respiratoria y 4) alcalosis metabólica. Pueden ser compensadas o descompensadas. Existen nomogramas que permiten caracterizar un trastorno conociendo los valores de pH y Pco_2. Si además se determina la concentración de Hb, se puede calcular el *exceso de base*. Los *aniones restantes* o *brecha de aniones* se obtienen de la suma algebraica $([Na^+] + [K^+]) - ([Cl^-] + [HCO_3^-])$, cuyo valor normal es de 10 a 15 mEq/L.

BIBLIOGRAFÍA

Arieff A.I., De Frunzo R.A. (1995). *Fluid, electrolyte and acid-base disorders*, 2da. Ed., Churchill Livingston, Nueva York.

Mota Hernández F., Velázques Jones L. (2004). *Agua y Electrólitos*, McGraw Hill Interamericana, México.

Rose B.D. (2000). *Clinical Physiology of Acid-Base and Electrolyte Disorders*, 5ta. Ed., McGraw Hill, Inc. Nueva York.

CAPÍTULO 29

Componentes minerales esenciales

MACROMINERALES

Calcio, fósforo, potasio, sodio, cloro, magnesio y hierro constituyen, en conjunto, sólo el 3,2 a 3,3% de la masa corporal de un adulto normal. Sin embargo, su importancia fisiológica es mucho mayor de lo que dicho porcentaje parece indicar. Estos elementos son indispensables para el normal desarrollo de los procesos biológicos.

SODIO

Un adulto normal posee 60 mEq de sodio por kg de masa corporal, es decir, un total de alrededor de 4.200 mEq (cerca de 100 g), de los cuales 55% se encuentra en los líquidos extracelulares, 40% en el hueso y el resto, en el compartimiento intracelular. Los depósitos de sodio pueden ser intercambiables y no intercambiables. Los primeros corresponden a todo el Na extracelular, todo el intracelular y menos de la mitad del contenido en el hueso. El no intercambiable se encuentra "atrapado" en la estructura ósea.

Sodio y cloruro son los electrólitos más importantes del compartimento extracelular, determinan en gran medida el volumen de ese espacio hídrico. El Na es mantenido en el espacio extracelular, principalmente por la acción de la "bomba de sodio" o Na^+,K^+-ATPasa.

Fuentes naturales. La concentración de sodio en los medios biológicos tiende a ser paralela a la de cloruro. La leche, carnes, huevos y vegetales sin agregados proveen sólo 10% del sodio consumido diariamente. La sal que se añade durante la preparación de las comidas constituye la principal fuente de ingreso. El 43% de la masa de NaCl corresponde al sodio.

La ingesta varía entre 100 y 200 mEq de sodio por día (6 a 12 g de NaCl); debe igualar a las pérdidas para mantener el balance. Es influida por el apetito de sal, regulado por el sistema renina-angiotensina. La sed también cumple una función significativa en la modulación del volumen de los espacios de distribución de agua en el organismo.

Absorción. Prácticamente la totalidad del sodio ingerido se absorbe en intestino. Menos del 5% es excretado con las heces. Ingresa en los enterocitos por varios mecanismos diferentes impulsados por el gradiente creado por la Na^+,K^+-ATPasa. Una pequeña parte puede utilizar la vía paracelular, a través de las uniones estrechas entre enterocitos. Desde el borde en cepillo el Na^+ pasa a la membrana basolateral, donde la Na^+,K^+-ATPasa lo expulsa hacia el espacio intersticial y de allí llega a la sangre.

La concentración de sodio en plasma se mantiene normalmente entre 135 y 145 mEq/L; en el líquido intersticial es ligeramente inferior, debido al equilibrio Gibbs-Donnan. En el espacio intracelular el nivel es mucho más bajo, con un promedio de alrededor de 10 mEq/L. Esta gran diferencia de concentraciones a uno y otro lado de la membrana plasmática es mantenida por la actividad de la "bomba de sodio".

Dada su elevada concentración en el líquido extracelular (LEC), el sodio es responsable de la mitad de la presión osmótica de ese compartimiento.

Excreción. La eliminación del Na se hace principalmente por orina (más del 90% del total). También se elimina sodio por la piel con el sudor, cuya concentración de sodio es de unos 50 mEq/L. El líquido evaporado por perspiración insensible prácticamente está libre de Na. En condiciones de temperatura y actividad física moderadas, la pérdida con el sudor es pequeña. Cuando la temperatura ambiente es elevada o cuando se realiza un esfuerzo físico intenso y sostenido, llega a ser importante.

La cantidad excretada por vía intestinal es muy pequeña (no más de 2 mEq/día), pero aumenta notablemente en casos de diarreas graves o aspiración de líquidos digestivos por sondas.

Manejo renal del sodio. La regulación de la excreción de Na^+ es el factor más importante en el mantenimiento del balance. En un adulto normal, los glomérulos renales filtran unos 27.000 mmoles de Na^+ por día. Más del 99% debe ser reabsorbido, ya que sólo se excretan 150 mmoles. El control de la reabsorción es la clave de la regulación de la homeostasis del sodio.

La excreción por orina es ajustada a la ingesta a fin de mantener el balance. Si se suprime totalmente el sodio de los alimentos, al cabo de 24 a 48 horas la cantidad de sodio eliminada por orina cae a niveles no detectables. La mayor parte del sodio filtrado en glomérulos se reabsorbe en túbulos contorneados proximales (70%) y el resto, en asa de Henle y túbulos distales y colectores.

La reabsorción de sodio en los túbulos es controlada por hormonas:

Angiotensina II. Regula la reabsorción de Na^+ en el túbulo contorneado proximal. También promueve la absorción de Na^+ y agua en intestino proximal. El volumen de plasma y la presión sanguínea tienden a elevarse. Otros efectos de la angiotensina II son secundarios a su capacidad para activar la síntesis y secreción de aldosterona.

Aldosterona. Es responsable de 5 a 10% de la reabsorción total de Na^+. Actúa a nivel del nefrón distal (células principales de los conductos colectores); induce aumento de la cantidad de canales de Na^+ en membrana apical y activa los canales preexistentes. Además promueve la excreción de K^+ e H^+ hacia la luz tubular y activa el pasaje de Na^+ hacia el espacio intersticial a través de la membrana basolateral. También favorece la absorción de sodio en el colon.

Factor natriurético atrial. Promueve la excreción de Na^+ cuando se expande el volumen del LEC. Aumenta la presión de filtración glomerular y disminuye la reabsorción de Na^+ en los conductos colectores medulares.

Necesidades diarias. Se recomienda una ingesta de 500 mg por día como mínimo. La ingesta de cantidades elevadas es desaconsejable.

Alteraciones de la homeostasis. La falla en los mecanismos homeostáticos altera el mantenimiento del balance del sodio. El contenido total de Na en el organismo puede variar ya sea por alteraciones en el ingreso o en la salida. No hay mecanismos eficaces para influir sobre el ingreso de sodio en respuesta a cambios del volumen vascular efectivo. Los ajustes se alcanzan principalmente por modificaciones en la eliminación de sal por el riñón.

Los trastornos que resultan en acumulación de sodio en el organismo tienden a aumentar el volumen de líquido en el espacio intersticial, con producción de edema. Esta situación se da en la insuficiencia cardíaca congestiva, hipoalbuminemia, enfermedades renales que comprometen la excreción de sodio e hiperaldosteronismo.

Por el contrario, se producen pérdidas importantes de sodio en: diarreas severas, fístulas o drenajes de líquidos intestinales, casos de sudoración exagerada sin reposición de sales, quemaduras extensas con trasudado de líquido y electrólitos a través de la piel, incapacidad para reabsorber sodio en los túbulos por insuficiencia renal o hipoaldosteronismo.

La concentración de sodio en plasma no siempre refleja las alteraciones del contenido total en el organismo. Puede suceder que una retención de sodio no se manifieste por *hipernatremia*. La hipernatremia se produce cuando hay exceso relativo de sodio con respecto al agua, o cuando hay pérdida proporcionalmente mayor de agua que de sodio. En estos casos, incluso se puede tener hipernatremia con déficit del sodio total.

La *hiponatremia* se presenta cuando las pérdidas de sodio superan a las de agua, o cuando el exceso de agua es proporcionalmente mayor que el de sodio, situación en la cual existe hiponatremia por dilución, aun cuando el contenido total de sodio en el organismo esté aumentado.

Dada la abundancia de sodio en los alimentos, la deficiencia de origen dietario es poco frecuente. Puede producirse por sudoración profusa que alcance al 3% del peso corporal. Sus síntomas comprenden calambres, náuseas, vómitos, mareos, shock y coma.

Sodio e hipertensión arterial. El aumento de Na, cualquiera sea su causa, resulta en elevación de la presión arterial relacionado con el incremento del volumen vascular efectivo.

La restricción de sal es efectiva para reducir la presión sanguínea. Un estudio reveló que una reducción de 4 g diarios en el consumo de sal produce una caída de 5 y 3 mm de Hg en las tensiones

sistólica y diastólica respectivamente en pacientes hipertensos; de 2 y 1 mm de Hg en normotensos.

POTASIO

El adulto normal posee unos 50 mEq de potasio por kg de masa corporal; un total de 3.500 mEq o 136 g, de los cuales 98% se encuentra en el espacio intracelular, donde constituye el catión más abundante. Su concentración en este compartimiento es próximo a 150 mEq/L. En el plasma sanguíneo y líquido extracelular (LEC) es de 4 a 5,5 mEq/L. La notable diferencia a uno y otro lado de la membrana plasmática es mantenida por el funcionamiento de la Na^+,K^+-ATPasa, que introduce K^+ en las células.

El potasio tiene dos funciones principales: a) Juega un papel importante en el metabolismo celular; por ejemplo, participa en procesos como la síntesis de proteínas y glucógeno. b) La relación entre sus concentraciones extracelulares (EC) e intracelulares (IC) es el principal determinante del potencial de reposo de membrana plasmática, condición previa para la generación de potenciales de acción, esenciales para la función nerviosa y muscular.

Fuentes naturales. El potasio se encuentra ampliamente distribuido en los alimentos, especialmente frutas, hortalizas y carnes. En efecto, aunque el contenido varía entre los componentes de la dieta habitual, todos poseen potasio, de modo que prácticamente es imposible elaborar una comida libre de potasio.

El mayor aporte de K procede de las frutas y hortalizas, particularmente bananas, cítricos, damascos, melón, tomates, papa. El arroz pulido y la harina de trigo son pobres en potasio. Las carnes y pescados tienen mayor contenido que las nueces y cereales en general.

La ingesta diaria con una dieta mixta es de unos 4 g (102 mEq). Esta cantidad es similar a todo el potasio contenido en el LEC.

Absorción. Más del 90% del potasio ingerido es absorbido en intestino delgado y colon.

Los mecanismos de absorción de potasio no son tan bien conocidos como los de sodio. Una vez dentro de las células intestinales, el K^+ difunde hacia el espacio intersticial y la sangre por canales de potasio.

Excreción. El riñón es el órgano principal responsable de la excreción de K^+ y de la modulación de su balance. Entre el 90 y 95% del potasio ingerido es eliminado por los riñones, en un proceso regulado que mantiene estable el contenido total de potasio en el organismo. El resto es excretado por sudor y heces y no es controlable. La pérdida con las heces es más o menos constante, normalmente menor del 10% de la ingesta, pero puede ser muy grande en pacientes con diarreas intensas. También hay pérdida importante en casos de vómitos incoercibles.

Manejo renal del potasio. Alrededor del 15% del total de K^+ filtrado en los glomérulos de una persona con dieta normal es excretado por la orina, indicando que el potasio es reabsorbido en los túbulos. Si la dieta contiene muy poco o nada de K^+, se elimina menor proporción, pero siempre queda algo del catión en orina (al menos 1% de la cantidad filtrada). Por esta razón, un individuo con una dieta pobre en K^+ puede desarrollar hipopotasemia. Cuando se consumen alimentos ricos en potasio, la cantidad excretada puede ser mayor que la filtrada, lo cual indica que el K^+ es también secretado.

La concentración de potasio [K^+] en plasma (potasemia o caliemia) y la aldosterona son los principales factores que regulan la secreción de potasio; la ADH tiene un efecto menor.

El aumento de la [K^+] extracelular (hipercaliemia) estimula la producción de aldosterona y ésta activa la secreción de potasio en los conductos colectores. La hormona produce incremento en el número y actividad de bombas Na^+,K^+-ATPasa en la membrana basolateral, elevando el K^+ intracelular; también aumenta el número de canales de K^+ en la membrana apical.

Regulación de concentraciones intra- y extracelulares. Las variaciones en la ingesta de K^+ son rápidamente amortiguadas por el intercambio entre LEC y las células. La cantidad total de K^+ en el LIC es tan grande comparada con la del LEC, que los desplazamientos del catión de uno a otro compartimiento pueden corregir cambios en la [K^+] del plasma con modificaciones insignificantes de la concentración intracelular.

En este intercambio tienen un importante papel la insulina y las catecolaminas.

Insulina. Promueve la entrada de K^+ en las células, especialmente en músculo esquelético e hígado. Produce estimulación de la Na^+,K^+-ATPasa de manera directa o secundaria a la activación del contratransportador Na^+/H^+. Este produce ingreso de Na^+, factor que incrementa el funcionamiento de la bomba de sodio.

Catecolaminas. Sus efectos difieren según actúen sobre receptores β_2 o α. Las acciones β_2 adrenérgicas favorecen la entrada de K^+ a las células mediada por Na^+,K^+-ATPasa. El mecanismo comprende aumento de AMP cíclico, fosforilación y activación de la bomba de sodio. En cambio, el estímulo de receptores α-adrenérgicos

promueve la salida de K^+ de las células. Las catecolaminas tienen también una acción indirecta. Estimulan la glucogenólisis, producen aumento de la glucemia y liberación de insulina. La insulina aumenta el ingreso de K^+ a las células.

Aldosterona. Al parecer favorece la entrada de K^+ a las células cuando hay *hipercaliemia*. No tiene efecto si la concentración de K^+ en plasma es normal.

Alteraciones de la homeostasis. El mantenimiento de la homeostasis del potasio es crítica, ya que las variaciones en la concentración de este catión influyen notablemente sobre la contractilidad de los músculos esquelético, cardíaco y liso y afectan la excitabilidad del sistema nervioso. También es importante en el balance de electrólitos y de la concentración de hidrogeniones.

En general, se produce exceso de potasio cuando hay fallas en la excreción renal por hipoaldosteronismo o insuficiencia renal. El aumento de potasio en plasma suele observarse en la acidosis metabólica (cetosis diabética), en la cual hay salida de K^+ desde las células hacia el LEC. El déficit de potasio es común en diarreas graves. En las alcalosis, el K^+ pasa desde el LEC hacia las células. El aumento del K^+ dentro de las células de túbulos distales del nefrón estimula la secreción de K^+, lo cual aumenta su eliminación por orina y tiende a disminuir el K^+ total del organismo.

Las variaciones de la concentración de potasio en plasma no se producen exclusivamente como reflejo de las modificaciones del contenido de potasio total del organismo; pueden ser originadas por desplazamientos entre los compartimientos intra y extracelular. En la cetosis diabética, por ejemplo, la hipercaliemia puede estar asociada a disminución del K^+ total. Dada la gran diferencia de concentraciones entre los dos espacios, una salida relativamente pequeña de potasio intracelular determina incrementos marcados de la potasemia.

La hipopotasemia produce alteraciones en la repolarización ventricular que se manifiesta por perturbaciones del ritmo cardíaco y cambios característicos en el electrocardiograma. El potencial de membrana tiende a aumentar en la hipopotasemia y a disminuir en la hiperpotasemia.

La hiperpotasemia se manifiesta por síntomas neuromusculares, debilidad muscular, confusión mental, parestesias y hasta parálisis. Hay arritmias cardíacas y alteraciones electrocardiográficas; éstas aparecen cuando la concentración de K en plasma pasa de 5,5 mEq/L. Niveles superiores a 6 mEq/L pueden producir paro cardíaco.

Ingesta recomendada. Es casi imposible la producción de hiperpotasemia por excesos dietarios en personas normales gracias al eficaz control de sus concentraciones en los líquidos orgánicos. Igualmente, es rarísima la hipopotasemia nutricional, salvo cuando hay falta absoluta de ingesta; la abundancia de K en los alimentos hace que el aporte sea suficiente aún con dietas pobres. De cualquier modo se sugiere una ingesta de 3,5 g de K por día, cantidad que es fácilmente provista por una alimentación bien balanceada.

Potasio e hipertensión sanguínea. Numerosos estudios han mostrado que una dieta rica en K disminuye la presión arterial. El consumo de frutas y hortalizas aporta buena cantidad de potasio y es recomendado en la prevención y control de la hipertensión arterial.

Un aumento de 40 mEq/L de potasio en la dieta reduce la presión arterial más que una disminución de 60 a 80 mEq/día de la ingesta de sodio. Probablemente el mecanismo de esta acción del K sobre la tensión sanguínea se debe al estímulo de la diuresis de Na.

CLORURO

Es el principal anión del líquido extracelular. El adulto normal posee unos 30 mEq de Cl por kg de masa corporal (2.100 mEq o cerca de 75 g de cloruro). Alrededor del 88% de ese total se encuentra en el LEC y el resto en el LIC. Las diferencias de potencial eléctrico existentes a través de la membrana plasmática (el interior de la célula es electronegativo con respecto al exterior) restringe el ingreso de Cl^- a las células.

Fuentes naturales. La mayor parte de los cloruros ingeridos con la alimentación está asociada con sodio en la sal de cocina. También se encuentran cloruros en los huevos, carnes y pescados. La ingesta promedio diaria de un adulto varía entre 100 y 200 mEq por dìa.

Absorción. La ingesta de cloruros es paralela a la de sodio, pues en su mayor parte el anión ingresa como NaCl. La incorporación de cloruros se realiza casi totalmente en intestino delgado, es más o menos similar a la de sodio, y se acopla al ingreso de éste en el cotransportador Na^+/Cl^-. La entrada de Cl^- en la célula en contra del gradiente electroquímico es impulsado por la energía derivada del pasaje simultáneo de Na^+ a favor del gradiente en el cotransportador Na^+/Cl^- y por la salida de HCO_3^- en el contratransportador Cl^-/HCO_3^-.

Hay también transporte paracelular de cloruro, que sigue al sodio absorbido para mantener la neutralidad eléctrica en el LEC.

En la mucosa gástrica existe un mecanismo de secreción de cloruro hacia el lumen, vía canales específicos. Desde los enterocitos, el Cl^- es

transferido al LEC a través de la membrana basolateral por canales selectivos de Cl^- y un cotransportador K^+/Cl^- accionado por el gradiente de K^+.

Cloruros en plasma. La concentración en plasma es de 102 mEq/L. Este valor es dependiente del estado de hidratación del organismo. Es posible que el contenido de Cl^- esté disminuido y sin embargo su concentración en plasma sea normal o hasta elevada si las pérdidas de cloruros y agua no son paralelas. Debido al equilibrio Gibbs-Donnan, el nivel de cloruro en líquido intersticial es algo mayor que en plasma; la inversa ocurre con el Na^+ y el K^+.

Excreción. La excreción se realiza por orina, piel y materias fecales; el riñón es el principal órgano de eliminación.

Manejo renal de cloruros. En condiciones normales, los túbulos renales pueden reabsorber la casi totalidad del cloruro en el filtrado glomerular. En éste, el Cl^- es el ion prevalente después del Na^+.

La reabsorción de Cl^- está más o menos asociada con la de Na^+ a todo lo largo del nefrón; la tasa de excreción es comúnmente similar para los dos iones e influida por los mismos factores.

Alteraciones del balance de cloruros. Las variaciones en el contenido de cloruros en el organismo suelen ser paralelas a las de sodio. En general, los excesos o déficits de Na^+ se acompañan de excesos o déficits de cloruros. Pueden existir excepciones en las alcalosis metabólicas (ej.: alcalosis producida por vómitos) en las cuales la pérdida de Cl^- es proporcionalmente mayor que la de Na^+.

La deficiencia de cloruro puede provocar convulsiones.

CALCIO

El calcio es el quinto elemento en orden de abundancia en el organismo, después del O, C, H y N y es el principal catión divalente en el líquido extracelular (LEC). Un varón adulto normal de 70 kg de masa posee alrededor de 1,4 kg de calcio; una mujer de 60 kg, aproximadamente 1,1 kg; un recién nacido a término contiene unos 25 g. El 99% del calcio total se encuentra en tejido óseo y el 1% restante, distribuido en los líquidos intravascular, intersticial e intracelular.

Al margen de estas consideraciones cuantitativas, debe destacarse la gran importancia fisiológica del calcio. Sus sales constituyen la porción mineral, responsable de las características estructurales y funcionales, del hueso. Además, el calcio iónico disuelto en los líquidos intra y extracelulares es esencial en numerosos procesos bioquímicos que incluyen excitabilidad nerviosa, contracción muscular, secreción de hormonas, regulación de enzimas y coagulación de la sangre.

El nivel de calcio en plasma sanguíneo es de 10 mg por dL (2,5 mM o 5 mEq/L) y constituye una constante celosamente mantenida. Las fluctuaciones diarias normales de la calcemia son menores del 3% de ese valor, aun cuando la ingesta de calcio registre grandes variaciones. La concentración de calcio permanece igual durante toda la vida; sólo se observan valores más elevados en sangre del cordón umbilical (11,6 mg por dL o 2,9 mM).

El calcio en plasma se encuentra en tres formas: a) *Calcio iónico* (Ca^{2+}), que representa aproximadamente 50% del total. b) *Calcio unido a proteínas*, principalmente albúmina (alrededor del 40% del total), en equilibrio dinámico con el calcio iónico del plasma. c) *Calcio no ionizable* (difusible), unido a aniones como citrato o lactato que forman sales no disociables.

El calcio iónico es la forma fisiológicamente activa, oscila entre 4,6 y 5,2 mg por dL (1,25 y 1,3 mM). El equilibrio entre calcio iónico y fijado a proteínas es afectado por cambios del pH de la sangre. Si éste aumenta (alcalemia), el calcio iónico disminuye y viceversa. Por cada 0,1 unidad de aumento del pH, el nivel de calcio iónico se reduce en 0,4%.

Obviamente, la fracción unida a proteínas está relacionada con la cantidad de proteínas presente, de modo que las alteraciones de la proteinemia (aumentada en la deshidratación, disminuida en enfermedades renales crónicas, insuficiencia hepática y malnutrición proteínica severas) producen cambios proporcionales en la cantidad de calcio fijado. Por cada gramo por dL de disminución de albúmina en plasma, el calcio disminuye 0,8 mg/dL.

Las determinaciones de la concentración de calcio total en plasma no dan información directa de la cantidad de calcio libre, que es la fracción relevante desde el punto de vista fisiológico. Sobre todo cuando existen alteraciones del pH sanguíneo o de la proteinemia; un paciente puede ser hiper- o hipocalcémico, aun cuando la concentración de calcio total (libre + unido) se encuentre dentro del rango normal (9,5 a 10,5 mg por dL). La medición directa de calcio iónico puede realizarse con métodos electrométricos.

La constancia de la concentración de calcio en LEC indica la existencia de un mecanismo homeostático notablemente eficiente; están involucradas en esta regulación las hormonas paratiroidea, calcitriol y, probablemente, calcitonina. Por otro lado, el tejido óseo representa un extenso

reservorio de calcio, que lo almacena o libera al LEC según las necesidades.

Fuentes naturales. Los alimentos más ricos en calcio son la leche y productos lácteos, especialmente queso y yogur. Un litro de leche de vaca provee algo más de 1 g de calcio.

Son buenas fuentes el salmón, las sardinas, almejas y ostras. Entre los vegetales, brócoli, coliflor, nabo y repollo. Las carnes, cereales (granos) y nueces son pobres en calcio.

La biodisponibilidad del calcio en adultos con una dieta normal es de alrededor del 30% del total contenido en los alimentos, especialmente en productos lácteos.

Absorción intestinal. Los ingresos de calcio dependen de la absorción intestinal. Con una dieta normal, un adulto absorbe alrededor del 30% de los 800 a 900 mg de calcio que ingiere por día.

El ingreso de calcio se realiza por dos mecanismos diferentes: transporte transcelular activo, saturable, y difusión pasiva paracelular. El principal sitio de absorción activa es el duodeno, mientras la difusión paracelular se produce en todo el intestino delgado. Si bien la absorción es más eficiente en el duodeno y en el yeyuno, la cantidad absorbida es mayor en el íleon, donde el contenido intestinal permanece más tiempo.

Cuando el contenido de calcio en la luz intestinal es elevado y el sistema de transporte activo se satura, una proporción creciente del Ca es captada por difusión pasiva.

El transporte transcelular comprende el pasaje a través de la membrana apical, transferencia hacia la membrana basolateral y salida por ésta hacia el espacio intersticial.

El ingreso se realiza impulsado por el gradiente electroquímico, no requiere aporte de energía y se realiza por canales específicos de la membrana apical. Apenas atravesados estos canales, el calcio se une a *calbindina*, proteína de 9 kDa en mamíferos (Ca_{9k}), distinta de la existente en intestino de aves, que tiene una masa de 28 kDa (Ca_{28k}). La calbindina fija dos iones calcio por molécula; sirve como transportador intracelular y como *buffer* de Ca^{2+}, pues evita el daño que el calcio libre causa en la célula.

El calcio viaja así a través del citoplasma hasta la membrana basolateral, desde donde es expulsado al espacio extracelular, contra el gradiente electroquímico, por dos mecanismos activos, la Ca^{2+}-ATPasa y el intercambiador Ca^{2+}/Na^+, transportador dependiente de la "bomba de sodio" con una estequiometría de 1 Ca^{2+} por 3 Na^+, de modo que es electrogénico.

La difusión paracelular se efectúa a través de las uniones estrechas entre células de la mucosa cuando la concentración de calcio en la luz intestinal es alta. Es un proceso pasivo, no saturable.

La absorción de Ca se adapta a las necesidades del organismo y a la cantidad presente en los alimentos. Una dieta pobre en calcio aumenta la eficiencia de su captación.

Hay factores dietarios que influyen el ingreso de calcio. La lactosa, otros azúcares y alcoholes derivados de monosacáridos, como el xilitol, favorecen la absorción.

Los fitatos (mioinositol hexafosfatos) presentes en legumbres, nueces y cereales, se unen al Ca y reducen su biodisponibilidad. Los oxalatos existentes en espinacas, remolacha, berenjena, frutillas, nueces, maní, té y chocolate, forman sales insolubles no absorbibles que se excretan con las heces.

Cuando los ácidos grasos libres son muy abundantes en intestino, forman jabones insolubles con el calcio e impiden su captación por la mucosa. Esto es importante en casos de esteatorrea.

Calcemia. El calcio absorbido llega al plasma sanguíneo, donde su concentración se mantiene con muy pocas variaciones en 10 mg/dL, repartido en una porción no dializable de 4,5 mg/dL unido a proteína y 5,5 mg/dL filtrable, que incluye 5,0 mg/dL de Ca^{2+} (iónico libre) y 0,5 mg/dL no disociable (combinado con citrato, fosfato, bicarbonato).

Excreción. La eliminación de calcio se hace por la orina, las heces y, en menor grado, por el sudor. La excreción por estas tres vías, en un adulto, es de alrededor de 300 mg por día. Una ingesta muy elevada de proteínas contribuye a aumentar la salida de calcio por orina. Durante la lactancia hay un egreso considerable por la glándula mamaria.

El calcio que se elimina con las materias fecales corresponde a la porción no absorbida de la dieta más el procedente de células descamadas de la mucosa y de las secreciones digestivas. Comprende aproximadamente unos 100 mg por día. La pérdida con el sudor es de unos 25 mg por día. También se elimina con las células descamadas de la piel, el pelo y las uñas.

Manejo renal del calcio. La mayor parte del Ca^{2+} absorbido cada día en intestino es excretada por los riñones para mantener el balance. Alrededor del 55-60% del calcio total presente en el plasma es difusible y filtra en los glomérulos. El 40% restante está unido a proteínas y no puede atravesar la membrana filtrante. Normalmente pasan a la luz tubular casi 10 g de calcio por día (500 mEq o 250 moles). El 98% de esta cantidad se reabsorbe y sólo 2% es excretado por orina (~200 mg/día).

El movimiento transcelular es impulsado a través de la membrana apical por el gran gradiente electroquímico (la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ es unas 10.000 veces menor que la concentración en el líquido tubular). Al igual que en las células de la mucosa intestinal, el calcio absorbido es transportado en el citoplasma unido a *calbindina*, que en riñón de mamíferos es de 28 kDa (Ca_{28k}) diferente de la Ca_{9k} de intestino.

La transferencia al espacio intersticial se cumple en la membrana basolateral por procesos activos: una bomba *Ca^{2+}-ATPasa* y un *intercambiador $3Na^+/Ca^{2+}$* que aprovecha el gradiente de Na^+ creado por la Na^+,K^+-ATPasa.

Los túbulos distales y los conductos colectores reciben aproximadamente 12% del total de calcio filtrado en los glomérulos y reabsorben más de dos tercios de esa cantidad. En todas las secciones del nefrón que reabsorben calcio por vía transcelular, el transporte dentro del citoplasma, desde la membrana apical a la basolateral, se efectúa en unión con *calbindina*. Las acciones que regulan la excreción de Ca^{2+} se cumplen en el nefrón distal.

Homeostasis del calcio. El flujo de calcio a través de los tejidos comprende cantidades importantes por día, hecho que hace más notable la capacidad del organismo para mantener la constancia de los niveles en el líquido extracelular (LEC). La homeostasis del calcio es controlada por factores endocrinos, principalmente la hormona paratiroidea y el 1,25-$(OH)_2$-D_3 (fig. 29-1).

Hormona paratiroidea (PTH). Es secretada cuando la concentración de calcio en LEC desciende por debajo de sus límites normales. Ejerce acción directa sobre hueso y riñón, e indirecta sobre intestino.

El esqueleto es un enorme depósito al cual se recurre cuando no se dispone de calcio exógeno. La PTH promueve la movilización rápida de calcio del tejido óseo por activación de la osteólisis; se libera calcio hacia el LEC. En riñón favorece la reabsorción de Ca y disminuye la de fosfato (aumenta la fosfaturia).

Sobre intestino, la PTH no tiene acción directa. La hormona induce 1α-hidroxilasa en riñón, con lo cual se activa la síntesis de 1,25-$(OH)_2$-D_3, que estimula la absorción de calcio en intestino e incrementa el ingreso de calcio al LEC.

El efecto total de la PTH es aumento de la calcemia sin elevación de la fosfatemia.

Vitamina D. Ejerce sus principales acciones después de su conversión en 1,25-$(OH)_2$-D_3 o calcitriol. En intestino, aumenta la absorción de calcio a través del borde en cepillo de las células de la mucosa y el transporte transcelular. Todos los mecanismos que favorecen la absorción intestinal de calcio son activados por calcitriol.

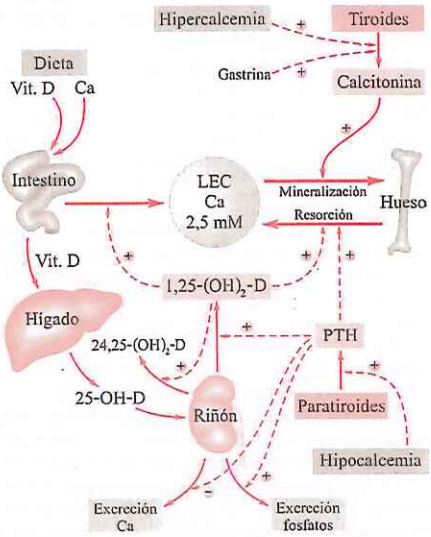


Figura 29-1. Factores de la homeostasis del calcio extracelular.

En hueso, los metabolitos de la vitamina D tienen efecto tanto en la mineralización como en la resorción. La resorción de calcio y su liberación hacia el LEC requiere la acción conjunta de 1,25-$(OH)_2$-D_3 y PTH.

Calcitonina. No está del todo aclarado su papel en el ser humano. Cuando se la administra farmacológicamente inhibe la resorción del hueso y disminuye la reabsorción renal de calcio y fosfatos. Con ello reduce los niveles de calcio y fosfato inorgánico en plasma.

La figura 29-1 resume los factores involucrados en la homeostasis.

Otras hormonas. Las hormonas de crecimiento, tiroideas, glucocorticoides y andrógenos tienen también participación en el proceso de formación de hueso, razón por la cual ejercen efectos sobre la homeostasis del calcio. Los estrógenos inhiben la resorción ósea mediada por PTH y deprimen la secreción de citoquinas (interleuquinas 1 y 6) y prostaglandina E_2, factores que favorecen la resorción. La caída en la producción de estrógenos contribuye a la osteoporosis, frecuentemente observada en mujeres posmenopáusicas.

Balance del calcio. El balance general del calcio en el organismo es positivo durante los períodos de formación y crecimiento óseo. Cuando

el desarrollo se ha completado, se alcanza un equilibrio y, aunque existe continua remodelacion del hueso, ingreso y salida de calcio se igualan. Después de los 45 años de vida el balance comienza a hacerse negativo; hay una disminución de mineral del hueso a razón de un 5% o más del total cada 10 años. En la mujer posmenopáusica, la tasa de descalcificación es mayor que en el hombre. La pérdida prolongada de calcio es causa de *osteoporosis*.

Alteraciones de la homeostasis. *Hipocalcemia*. La reducción del calcio en plasma puede obedecer a variadas causas: a) hipoparatiroidismo (congénito, adquirido, resistencia de los órganos efectores), b) deficiencias de vitamina D (o alteraciones de su metabolismo), c) defectos tubulares renales (con falla en la reabsorción), d) deficiencias dietarias graves y prolongadas

Cuando el nivel plasmático cae por debajo de lo normal, se moviliza Ca^{2+} óseo a fin de normalizar la calcemia, comprometiendo la formación de hueso.

La caída del calcio iónico extracelular por debajo de 3,5 mg por 100 ml (~ 0,83 mM) provoca aumento de la excitabilidad neuromuscular y puede llevar a la tetania (contractura sostenida de músculos).

Hipercalcemia. Se produce en el hiperparatiroidismo, la intoxicación con vitamina D, sarcoidosis, algunos tumores malignos.

Regulación del calcio intracelular. El calcio, además de ser un importante componente del tejido óseo y dentario, desempeña una variedad de funciones que relacionan a este catión con la actividad del sistema nervioso, la contracción muscular, la motilidad celular, las acciones hormonales, etc. Mientras los mecanismos homeostáticos aseguran el mantenimiento de los niveles de calcio en el LEC, las múltiples funciones mencionadas dependen de variaciones rápidas en la concentración intracelular de calcio, que también requieren un riguroso control.

La concentración de calcio en el citoplasma $[Ca^{2+}]_i$ es del orden de 0,1 μM, es decir, alrededor de 10.000 veces menor que la existente en LEC. El enorme gradiente a ambos lados de la membrana plasmática facilita la producción de cambios súbitos en la concentración intracelular del catión. En efecto, la concentración citoplasmática de calcio puede incrementarse 10 o más veces en cuestión de milisegundos por ingreso de una cantidad relativamente pequeña de iones desde el espacio extracelular, o por liberación del catión desde depósitos en el retículo endoplásmico (sarcoplásmico en músculo), mitocondrias y otros. Ese aumento constituye la señal para una multitud de acciones fisiológicas.

Ingreso de Ca^{2+}. Distintos estímulos, actuando sobre receptores de membrana plasmática, promueven el ingreso de Ca^{2+} y elevan bruscamente su concentración en el citosol. El Ca se convierte así en un "mensajero" de sistemas de transmisión de señales utilizados por hormonas y otros agentes.

El mecanismo principal de generación de señales de calcio es el ingreso desde el LEC, impulsado por el elevado gradiente electroquímico a través de la membrana plasmática. Existen varios tipos de canales de entrada de Ca^{2+}: a) *Accionados por voltaje* (VOC, de *voltage operated channels)*. Se encuentran principalmente en células excitables y generan rápido influjo de Ca^{2+}, que activa procesos como contracción muscular y exocitosis. b) *Accionados por ligandos* (ROC, de *receptor operated channels*), responden a diferentes agentes que se unen específicamente a ellos desde el exterior (ej.: neurotransmisores) o desde el interior (ej.: segundos mensajeros). c) *Capacitativos* (SOC, de *store operated channels*), controlados por la cuantía de los depósitos intracelulares.

Egreso de Ca^{2+}. A fin de mantener la $[Ca^{2+}]_i$ debe expulsarse del citosol la misma cantidad incorporada por los "pulsos" de calcio. El principal encargado de esta misión es una *Ca^{2+}-ATPasa* de membrana plasmática de alta afinidad, que le permite responder aun a pequeñas elevaciones de la $[Ca^{2+}]_i$. En la tarea de exportar calcio colabora un intercambiador Na^+/Ca^+ impulsado por el gradiente de Na^+ creado por la Na^+,K^+-ATPasa. Se trata de transporte activo secundario, electrogénico, ya que por cada Ca^{2+} expulsado ingresan 3 Na^+.

Flujos de calcio de depósitos intracelulares. Los depósitos internos acumulan Ca^{2+} por procesos activos y lo liberan al citosol por canales accionados por ligandos.

Retículo sarco/endoplásmico (RE). En membranas del retículo opera una "bomba" *Ca^{2+}-ATPasa* (SERCA, de *sarco/endoplasmic Ca^{2+}-ATPase*) que introduce Ca^{2+} en el lumen.

La liberación de calcio desde el RE se realiza a través de dos tipos de canales, ambos sensibles a la $[Ca^{2+}]$. Uno de los dos tipos de canales, activado por Ca^{2+}, y por inositol-1,4,5-trisfosfato, es llamado *receptor de inositol-1,4,5-trisfosfato (I-1,4,5-P_3R)*. El otro, designado *receptor de rianodina* (RyR) se abre por bajas concentraciones de Ca^{2+} citosólico y por *adenilribosa cíclico* (ADPc); es inhibido por calmodulina y por estimulación β adrenérgica.

Mitocondrias. Estas organelas importan calcio desde el citosol por medio de un *uniporter* impulsado por el potencial negativo de la matriz. La salida de Ca^{2+} es mediada por un intercambiador Na^+/Ca^{2+}.

Las mitocondrias actúan amortiguando los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$. Ante una sobrecarga de calcio citosólico se activa el *uniporter* y se acumula el catión en la matriz. Cuando ya se ha normalizado la $[Ca^{2+}]$ en el citosol, las mitocondrias van liberando el calcio a un ritmo adecuado a la capacidad de exportación de la membrana plasmática. De esta manera, la $[Ca^{2+}]_i$ se mantiene en sus niveles basales. Las mitocondrias cumplen una función *buffer* con respecto al calcio citosólico. La figura 29-2 resume esquemáticamente los procesos mencionados.

Aparato de Golgi. Importa Ca^{2+} por medio de una *Ca^{2+}-ATPasa* y lo libera por un canal activado por I-1,4,5-P_3R.

Unión de Ca^{2+} a proteínas específicas. Se han reconocido ~200 proteínas que unen específicamente Ca^{2+} en las células. Entre estas proteínas se pueden distinguir las que cumplen un papel *buffer* de calcio, y las que actúan como efectores. Las *proteínas buffer* funcionan como reguladoras de la señal de calcio, las *efectoras*, cuando se unen al calcio, sufren cambios conformacionales que las habilitan para actuar directamente sobre el sustrato, a veces catalíticamente. Una de las proteínas efectoras más extensamente distribuida es la *calmodulina*, con cuatro sitios de unión para calcio (pág. 502).

La figura 29-2 presenta los factores relacionads con la regulación del Ca intracelular.

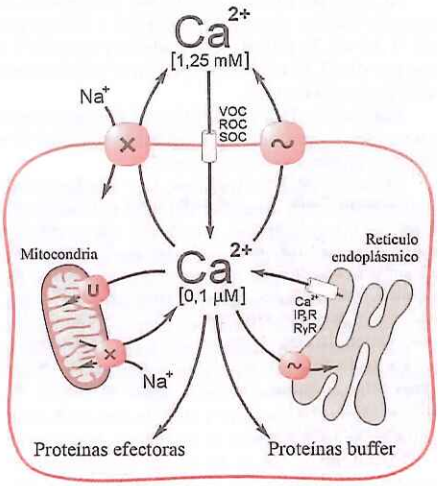


Fig. 29-2. Regulación del Ca intracelular. ~: Ca^{2+}-ATPasa, X: intercambiador Na^+/Ca^{2+}, U: uniporter, IP_3R: receptor de inositol-1,4,5-trisfosfato, RyR: receptor de rianodina, VOC: canal operado por voltaje, ROC: canal operado por ligando, SOC: canal capacitativo.

Requerimiento. Varía en distintas épocas de la vida. En los dos primeros años se deben absorber 120 mg de calcio por día para sostener un crecimiento normal. Para proveer esta cantidad los niños alimentados a pecho requieren una ingesta de 300 mg/día, que corresponde a lo contenido en la secreción diaria promedio de leche materna. Con leche de vaca la biodisponibilidad es algo menor, por lo que deben proveerse 400 mg (aproximadamente medio litro/día).

De 2 a 9 años la absorción diaria es de 220 mg, lo que requiere el aporte de unos 600 mg con los alimentos. En adolescentes entre 10 y 17 años, ocurre un notable aumento de la mineralización del hueso, algo más temprano en niñas que en varones. Deben absorberse unos 440 mg de Ca por día, que se satisfacen con una ingesta de 1.300 mg. En adultos los requerimientos para mantener el balance son de unos 320 mg, provistos por una ingesta de 1.000 mg diarios. Adultos mayores de 45 años presentan reducción de la absorción, razón por la cual la ingesta debe ser de 1.300 mg.

En mujeres menopáusicas hay pérdidas extra por orina, lo que requiere calcio dietario adicional. Se recomienda consumir 1.300 mg por día. Durante el embarazo, especialmente en el último trimestre, las necesidades aumentan ya que en este período el feto retiene unos 240 mg por día. La mujer embarazada absorbe con mayor eficiencia el calcio de los alimentos; la ingesta recomendada es de 1.200 mg por día. Las mujeres lactantes segregan unos 36 mg de Ca con cada 100 mL de leche; para una producción diaria de 750 ml, esto representa 270 mg. Si se agregan las pérdidas urinarias y por otras vías, con una eficiencia máxima de absorción, el requerimiento diario es de 1040 mg y el aporte recomendado es de 1.300 mg.

Ingestas de hasta 2,5 g de calcio por día no causan efectos nocivos y son consideradas como límite máximo tolerable. El consumo de cantidades mayores puede producir hipercalcemia y depósito de Ca en tejidos blandos. En pacientes con hipercalciuria, la ingesta excesiva de Ca aumenta el riesgo de formación de cálculos renales.

Deficiencia. Puede deberse a ingesta o absorción insuficiente de calcio o a pérdidas excesivas. El riesgo de deficiencia es mayor en los dos primeros años de vida y durante la pubertad y adolescencia. También en las embarazadas, especialmente en el tercer trimestre de gestación, en las mujeres lactantes y en las posmenopáusicas. Los varones mayores de 65 años constituyen otro grupo poblacional en riesgo.

La disminución de los niveles de calcio iónico en plasma (hipocalcemia) puede provocar *tetania*, caracterizada por contracción muscular

sostenida, especialmente en manos, brazos y piernas, dolores musculares y parestesia.

La deficiencia de calcio en niños puede producir un cuadro semejante al del raquitismo (ver Cap. 26). En adultos, se produce osteoporosis, con pérdida de la masa ósea, tanto de los minerales como de la matriz proteica. Está aumentada la fragilidad ósea y el riesgo de fracturas.

FÓSFORO

El fósforo es componente de sustancias de gran importancia funcional, tanto desde el punto de vista estructural como metabólico. Es excepcional que algún compuesto fosforado no esté presente en la constitución de estructuras celulares o en etapas metabólicas.

Un adulto normal contiene unos 700 g de fósforo, algo más el varón que la mujer (alrededor de 1% dela masa corporal). El 85% de esa cantidad se encuentra en hueso, principalmente en forma de *hidroxiapatita* [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$], estructura cristalina que constituye la casi totalidad de la porción mineral del hueso. Poco menos del 15% del fósforo total se encuentra en tejidos blandos y un 0,3%, en los líquidos extracelulares. En las células y LEC el fósforo, como fosfato, se encuentra en ésteres orgánicos, o integrando ácidos nucleicos, fosfolípidos y fosfoproteínas. Los fosfatos inorgánicos (P_i) se encuentran, al pH de los líquidos corporales, casi totalmente como aniones di- y monovalente (HPO_4^{2-}, $H_2PO_4^-$).

Fuentes naturales. Los alimentos más ricos en fosfato son: carne, pollo, pescados, huevos, leche y derivados lácteos. Nueces, legumbres y cereales contienen P, pero la biodisponibilidad es mayor en productos de origen animal. El café y el té proveen algo de fosfato. Las bebidas tipo cola tienen ácido fosfórico.

El fosfato no está libre en los alimentos; se lo encuentra en compuestos orgánicos e inorgánicos. En su forma orgánica está unido a proteínas, azúcares y lípidos. Las cantidades relativas de P orgánico e inorgánico varía según el tipo de dieta. En la leche, por ejemplo, un tercio del P total es fosfato inorgánico. Más del 80% del P en cereales (trigo, maíz y arroz), legumbres y nueces se encuentra como fitato, que es el hexafosfato de mioinositol.

Absorción. Los fosfatos están ampliamente distribuidos en los alimentos. Los unidos a moléculas orgánicas deben ser hidrolizados en la luz intestinal para liberar P_i, que es la forma absorbible. La fosfolipasa C cataliza la separación de fosfato del glicerofosfato de fosfolípidos, mientras la fosfatasa alcalina, estimulada por calcitriol, en el borde en cepillo de los enterocitos libera fosfato de algunos compuestos orgánicos. La biodisponibilidad del P de la dieta varía entre 50 y 70%.

Los fosfatos inorgánicos se absorben en todo el intestino delgado, principalmente duodeno y yeyuno, por difusión pasiva y por transporte saturable. La absorción pasiva se realiza por vía paracelular cuando la concentración luminal de P_i excede 1,5 mM, lo que habitualmente ocurre después de una comida.

El pasaje a través de la membrana apical es mediado por un cotransportador Na^+/P_i impulsado por el gradiente de sodio y estimulado por calcitriol. La salida de P_i hacia el espacio intersticial está a cargo de un transportador independiente de Na^+, impulsado por el gradiente electroquímico.

Para asegurar una absorción adecuada de Ca y fosfatos, la cantidad de ambos en la dieta debe guardar cierta proporción. Una relación Ca:P de 2:1 posibilita una absorción óptima; si el P supera al calcio, tienden a formarse fosfatos de Ca insolubles que se eliminan con las heces. Una relación Ca:P de 1:1 es satisfactoria.

Fosfatemia. El fosfato aparece en sangre una hora después de la ingestión. Setenta por ciento del P en el plasma se encuentra unido a compuestos orgánicos, como los fosfolípidos de lipoproteínas. Del restante 30% la mayor parte está como HPO_4^{2-} y $H_2PO_4^-$; al pH normal del plasma la relación $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$ es de 4:1.

El nivel de fósforo en plasma (expresado en peso de fósforo elemental) es de 2,5 a 4,8 mg por dL (1,45 a 2,78 mEq/L) en el adulto y de 4,0 a 7,0 mg por dL (2,37 a 4,06 mEq/L) en el niño durante el primer año de vida.

Excreción. Del 70 al 90% del P es excretado en su forma inorgánica por orina. El restante 10 a 30% es eliminado con las heces.

Manejo renal de fosfatos. Los túbulos proximales reabsorben alrededor del 85% del fosfato filtrado en los glomérulos; menos del 5% es captado en la rama ascendente gruesa del asa de Henle, los túbulos contorneados distales y los conductos colectores. Aproximadamente el 10% del total de fosfato contenido en el filtrado es excretado por orina.

La reabsorción sigue la vía transcelular. En la membrana luminal hay cotransportadores $2Na^+/HPO_4^{2-}$ que ingresan fosfato desde el lumen. La transferencia al espacio intersticial la efectúa un intercambiador anión/fosfato de membrana basolateral.

El calcitriol, la hormona de crecimiento, el factor de crecimiento I tipo insulina, la insulina y la hormona tiroidea estimulan la reabsorción de fosfato en los túbulos renales; la calcitonina, a altas dosis, la reduce. La hormona paratiroidea estimula la excreción renal.

Homeostasis. En las secciones precedentes se han mencionado algunos de los factores que regulan el mantenimiento de los niveles de P en los tejidos y líquidos orgánicos. En el adulto normal el balance entre entradas y salida es cero. Los niveles de fosfato son controlados por diversos factores que incluyen absorción intestinal, reabsorción en riñón y depósito o liberación en huesos. En la modulación de estos procesos intervienen hormonas como la paratiroidea, el $1,25(OH)_2D_3$, glucocorticoides, dopamina, insulina y otras. Recientemente se ha demostrado la existencia de varios péptidos fosfatúricos genéricamente denominados *fosfatoninas*. El mejor estudiado de estos factores es el *factor de crecimiento de fibroblastos 23* (FGF-23), producido en el tejido óseo y liberado cuando los niveles de fosfato en el LEC aumentan. El FGF-23 inhibe la expresión de los transportadores Na^+/P_i en los túbulos renales; reduce la reabsorción de fosfato y aumenta la fosfaturia. También inhibe la actividad de 1α-hidroxilasa en riñón, lo que disminuye la producción de calcitriol y con ello la absorción de fosfato en intestino y la reabsorción en túbulos renales.

Funciones del fosfato. El fosfato ejerce muchas funciones en el organismo. La mayor parte se encuentra en el hueso, donde contribuye a otorgarle sus características estructurales y funcionales. En las células y en los espacios extracelulares forma parte de numerosas moléculas esenciales.

Mineralización del hueso. El P tiene un papel de la mayor importancia, principalmente como componente de la hidroxiapatita que se deposita sobre el colágeno durante la mineralización del hueso.

Constitución de nucleótidos. El fosfato es un importante componente de los ácidos nucleicos (ADN y ARN). Como integrante de nucleótidos libres participa en el metabolismo intermedio, en el almacenamiento y transferencia de energía en compuestos como el adenosina trifosfato (ATP), la creatina fosfato y otros. UTP y UDP actúan en reacciones metabólicas de activación y transferencia de compuestos.

Segundos mensajeros intracelulares. Como constituyente de AMP cíclico (AMPc) e inositol trisfosfato (IP_3) interviene en sistemas de señalización intracelular.

Fosfoproteínas. La activación de proteína quinasas promueve la fosforilación de proteínas específicas (enzimas y otras), modificando su actividad.

Constituyente de membranas. Los fosfolípidos son componentes esenciales de las membranas celulares. Sus propiedades anfifílicas le permiten formar la estructura básica en doble capa.

Equilibrio ácido-base. Dentro de las células, los fosfatos constituyen el principal . En el riñón, el Na_2HPO_4 del filtrado reacciona con H^+ y libera sodio, contribuyendo a la recuperación de bases y eliminación de iones hidrógeno por orina.

Transporte de O_2 por la hemoglobina. En los eritrocitos, el 2,3-bisfosfoglicerato se asocia a la hemoglobina y disminuye su afinidad para el oxígeno. Esto favorece la liberación de O_2 en los tejidos.

Ingesta recomendada. Se recomiendan las mismas cantidades indicadas para el calcio: 800 mg por día en el adulto, 200 a 800 mg en el niño, con aumento progresivo de 0 a 9 años; 1.250 mg en adolescentes, embarazadas y madres lactantes. El consumo de medio litro de leche de vaca por día para el adulto y de 1 litro para adolescentes y mujeres durante el embarazo y lactancia satisface tanto las necesidades de P como las de Ca.

Deficiencia. La hipofosfatemia es una condición relativamente rara, ya que la dieta habitual provee buenas cantidades de P. Se produce por aumento de la excreción renal de fosfatos, disminución de la absorción intestinal o pérdidas exageradas por vía digestiva y por otras causas; diversas condiciones patológicas determinan hipofosfatemia, entre ellas la acidosis, que estimula la excreción de fosfato.

Se observa en individuos que ingieren gran cantidad de antiácidos con Al, Mg o Ca, los cuales reducen la absorción intestinal de P y en personas con inanición realimentadas súbita y exageradamente por sonda gástrica o por vía parenteral sin proveer fosfato adicional. A este cuadro suele denominársele "síndrome de realimentación".

Como el fosfato participa en gran número de reacciones, su deficiencia afecta a todas las células. Los síntomas clínicos se hacen evidentes cuando la fosfatemia cae por debajo de 1,5 mg por dL y comprenden anorexia, pérdida de mineral del hueso, debilidad muscular, alteraciones neurológicas (ataxia, parestesia). Estos síntomas son la expresión de un trastorno metabólico generalizado, en el que priman la reducción de los niveles de ATP en las células y de 2,3-bisfosfoglicerato (BPG) en eritrocitos. El oxígeno no se desprende con facilidad y se produce hipoxia. La hipofosfatemia es una condición seria, potencialmente fatal.

MAGNESIO

Se encuentra en todas las células y líquidos del organismo. Cuantitativamente es el segundo catión del líquido intracelular (después del potasio) y el cuarto en la composición corporal total (después de Na, K y Ca). Un adulto de 70 kg contiene entre 25 y 30 g de magnesio, más de la mitad en el hueso, formando complejos con calcio y fosfato.

El magnesio es un elemento esencial en numerosas reacciones enzimáticas. Está presente en todas aquellas en las cuales participan ATP, GTP o UTP y en las catalizadas por pirofosfatasas. En algunos casos, el Mg^{2+} puede ser sustituido por Mn^{2+}.

Es predominantemente intracelular (sólo 1% del magnesio corporal total es extracelular); su concentración dentro de la célula es diez o más veces mayor que la existente en plasma. La relación entre Mg^{2+} y Ca^{2+} es algo semejante a la existente entre K^+ y Na^+.

Fuentes naturales. Son ricos en magnesio los granos enteros, las legumbres (porotos, soja) y hortalizas de hojas verdes; éstas tienen buena cantidad ya que el Mg es constituyente de la clorofila. También se lo encuentra en nueces, frutas, carnes, productos lácteos, chocolate, café y té. El procesamiento y preparación de los alimentos, así como la molienda de cereales con eliminación del salvado reducen hasta 80% del Mg original.

Absorción. Se absorbe en intestino delgado, principalmente en yeyuno e íleon; parte también en el colon. En personas adultas normales la biodisponibilidad es del 30 a 70% del total presente en los alimentos.

El porcentaje absorbido en intestino delgado guarda relación inversa con la cantidad ofrecida. Cuando la dieta contiene poco magnesio se absorbe mayor proporción del total que cuando es abundante.

Varios factores influyen sobre la absorción intestinal. Fitato, fibra no fermentable y oxalato la interfieren. Cantidades importantes de ácidos grasos no absorbidos (esteatorrea) forman con el Mg jabones insolubles que se excretan con las heces. Calcio, fosfato y otros minerales, por ejemplo zinc, reducen el ingreso, especialmente cuando el consumo de Mg es pobre. Algunos carbohidratos (fructosa, lactosa) mejoran la absorción.

El 1,25-$(OH)_2$-D_3 a dosis fisiológicas no tiene influencia sobre la absorción de magnesio. Dosis farmacológicas estimulan el transporte activo.

La salida de Mg al espacio intersticial a través de la membrana basolateral se hace quizás por un transportador aún no identificado.

Magnesemia. El Mg aparece en sangre una hora después de la ingesta. La concentración normal en plasma sanguíneo es de 1,5 a 3,0 mg por dL (0,625 a 1,25 mM o 1,25 a 2,5 mEq/L); 30% de esa cantidad se encuentra unido a proteínas, predominantemente albúmina, 55% está libre, al estado iónico, y el resto complejado con diversos aniones.

Excreción. El riñón es el principal órgano de excreción. Otras dos vías de eliminación son las heces, con las cuales egresa el Mg no absorbido y pequeña cantidad del endógeno, y el sudor, que excreta muy pequeña cantidad (15 mg por día).

Manejo renal del magnesio. Aproximadamente la tercera parte del magnesio ingerido es eliminado por orina. Alrededor del 70% del total de Mg en el plasma, que comprende las fracciones ionizada y la asociada en complejos difusibles, filtra en los glomérulos (aproximadamente 100 mmoles o 2.400 mg por día); una gran proporción es reabsorbida en los túbulos proximales. La reabsorción en los túbulos distales y conductos colectores (5 a 10% del total filtrado) se realiza, a favor del gradiente electroquímico, a través de canales de Mg^{2+}.

Homeostasis. El balance de magnesio en el organismo es regulado por la acción concertada de la absorción intestinal, la reabsorción renal y el intercambio en el hueso.

La hormona paratiroidea estimula la reabsorción de Mg^{2+} en el asa de Henle. Al parecer, la hormona paratiroidea y la aldosterona participan también en el control de la magnesemia.

El hueso es un importante reservorio de Mg; alrededor del 55% del total en el cuerpo se encuentra en el tejido óseo, depositado en el momento de la mineralización. El 70% de esa cantidad está asociado con fosfato y calcio en la retícula cristalina y el resto en la superficie, en forma amorfa. Este último sería el magnesio intercambiable que se moviliza para mantener los niveles en plasma. El Mg que no forma parte del hueso se distribuye en tejidos blandos, principalmente músculo (25%), hígado y riñón.

Funciones. Dentro de las células el Mg se asocia a fosfolípidos en membranas plasmática y de organelas, a ácidos nucleicos y proteínas. Está relacionado con más de 300 reacciones, ya sea como cofactor estructural o activador alostérico de enzimas. Hasta 90% está unido a nucleótidos, principalmente ATP y ADP, formando complejos $Mg^{2+}ATP^{3-}$ o $Mg^{2+}ADP^{2+}$ en los que el Mg asiste en la transferencia de fosfato.

Algunas de las acciones en las que participa son: 1) Vía glucolítica (hexoquinasa y fosfofructoquinasa). 2) Vía de pentosafosfato (transcetolasa). 3) Ciclo del ácido cítrico (descarboxilaciones oxidativas). 4) Formación de creatina (creatina quinasa). 5) Iniciación de la β-oxidación de ácidos grasos (acil-CoA sintetasa). 6) Síntesis de ácidos nucleicos. 7) Transcripción de ADN. 8) Síntesis de proteínas 9). Activación de aminoácidos. 10) Contractilidad y excitabilidad de músculos esquelético, cardíaco y liso. 11) Reacciones catalizadas por fosfatasa alcalina y pirofosfatasa. 12) Formación de AMP cíclico (adenilato ciclasa). 13). Coagulación de la sangre. 14) Regulación de canales de iones, especialmente de K. 15) Hidroxilación de vitamina D en hígado. 16) Homeostasis del calcio (secreción y acciones

de la PTH en hueso, riñón e intestino, activación de Ca^{2+}-ATPasa).

Ingesta recomendada. Los requerimientos de magnesio se calculan en 400 mg por día para el varón de 19 a 30 años y 420 mg para los mayores de 30 años. Mujeres de 19 a 30 años, 310 mg y mayores de 30, 320 mg. Durante el período de embarazo y lactancia se aconseja una ingesta de 350 mg/día.

Normalmente el Mg en exceso es eliminado rápidamente por vía urinaria, de modo que no se observan aumentos significativos en plasma. Una ingesta elevada de Mg no es tóxica, excepto en pacientes con insuficiencia renal.

Alteraciones de la homeostasis. La deficiencia de Mg es rara en la población general gracias a su abundancia en los alimentos comunes. En la clínica puede observarse en complicaciones posquirúrgicas, en transfusiones masivas (efecto quelante del citrato), síndrome de realimentación en pacientes con inanición, cetoacidosis diabética, quemaduras extensas y en un alto porcentaje de alcoholistas.

La hipomagnesemia es asintomática a menos que los niveles sean menores de 0,5 mmoles/L (1,2 mg/dL). Con estos niveles aparecen síntomas como náuseas, vómitos, anorexia, debilidad muscular, cambio de personalidad y alucinaciones, espasmos, temblores y hasta tetania, síntoma que también se observa en la hipocalcemia; la hiperexcitabilidad puede provocar arritmias y paro cardíaco. La hipermagnesemia tiene efectos depresores sobre el sistema nervioso central.

HIERRO

El hierro representa una proporción muy pequeña de la masa total de seres vivos (alrededor del 0,0057% de la masa corporal en humanos). La mayoría de autores lo incluyen entre los oligoelementos.

Pese a su escasa relevancia cuantitativa, el hierro es un componente de enorme importancia. En mujeres adultas el contenido total de Fe es de unos 3 g y en el varón, de 4 g. Normalmente esta cantidad presenta variaciones relacionadas con el peso corporal, la edad y condiciones fisiológicas, como el embarazo.

Distribución. El hierro cumple un papel primordial en el organismo como integrante de moléculas que desempeñan actividades de importancia vital. En esas moléculas se encuentra el Fe que puede llamarse *funcional* y representa del 79 al 80% del total. La mayor parte (65%, 2,0 g en la mujer y 2,6 g en el varón) es componente de la *hemoglobina*, encargada del transporte de oxígeno en la sangre. Un 10% (0,3 g en la mujer y 0,4 g en el varón) está en la *mioglobina*, que transporta y retiene oxígeno en el músculo. Un 2,5 % (0,075 g y 0,10 g en la mujer y el varón respectivamente) corresponde a los citocromos de la cadena respiratoria de mitocondrias y de los complejos de la familia de citocromo P_{450}, y a numerosas enzimas como catalasa, oxigenasas, peroxidasas y otras que participan en reacciones de oxidorreducción. Todas las mencionadas son *hemoproteínas*, es decir, poseen *hem* o *hemo* como grupo prostético. En el hemo el Fe está engarzado en el centro del anillo tetrapirrólico de la protoporfirina IX y es el elemento clave o determinante de las propiedades funcionales de las hemoproteínas (fig. 3-26).

Dentro de la categoría de proteínas relacionadas con actividades enzimáticas existen también otras que poseen hierro pero no hemo. Son proteínas *no hemínicas*, con alrededor de 2,0% (0,06 a 0,08 g) del total de Fe. Algunas de estas moléculas tienen agrupamientos hierro-azufre (Fe-S, 2Fe-2S, 3Fe-3S, 4Fe-4S) como los existentes en los complejos I, II y III de la cadena respiratoria en las mitocondrias, en la aconitasa (ciclo de Krebs), en la ferroquelatasa (última etapa de síntesis de hemo), oxidasas (ribonucleótido reductasa), la glicerolfosfato deshidrogenasa y otras son metaloenzimas con Fe.

Cerca del 20% del total de Fe es representado por la *reserva* (hierro en depósito) del organismo. Está complejado con proteínas, *ferritina* y *hemosiderina*, presentes prácticamente en todas las células, que almacenan Fe cuando está en exceso y lo ceden cuando es requerido.

Finalmente, un 1% corresponde al hierro *transportado* en la sangre en unión a *transferrina*.

Toxicidad del Fe. En el organismo el hierro se encuentra en dos estados de oxidación, ferroso (Fe^{2+}) y férrico (Fe^{3+}). El Fe libre, especialmente el Fe^{2+}, puede causar serios daños en los tejidos; por esta razón siempre está ligado a proteínas tanto en las células como en el plasma sanguíneo. La toxicidad del hierro libre se debe a su capacidad para formar radicales libres.

Fuentes naturales. Los alimentos más ricos en hierro incluyen hígado, corazón, carnes de cualquier tipo, mariscos, tomate, porotos, coliflor. Aunque en menor cantidad, también se encuentra este elemento en los vegetales verdes, cereales, legumbres y frutas secas. La leche y derivados son muy pobres en hierro.

En los alimentos de origen animal, alrededor de un 60% del hierro se encuentra en hemoproteínas y el resto en proteínas no hemínicas. Todo el Fe de los vegetales está asociado a proteínas no hemínicas.

Balance del hierro. El organismo normal es muy eficiente en la administración del hierro; lo recicla constantemente, con muy pequeña pérdida. Como ejemplo puede citarse el caso del Fe de la hemoglobina: los glóbulos rojos que llegan al fin de su vida útil al cabo de unos 120 días son lisados y la hemoglobina que contienen degradada en órganos del sistema de fagocitos mononucleares, principalmente el bazo. Se estima en 8 a 9 g la cantidad de Hb catabolizada por día, lo que representa 25 mg de hierro. De este total, el 95% (unos 24 mg) es reutilizado para la síntesis de nueva hemoglobina. El reciclado es muy activo; dentro de las 12 horas siguientes a la destrucción de los eritrocitos, el 60% del Fe que contenían ya está incorporado en la Hb neoformada.

Diariamente un adulto normal pierde 1 mg de hierro, de las células epiteliales descamadas (mucosa gastrointestinal, piel y tracto urinario) y de la pequeña cantidad de sangre que eventualmente se elimina con las heces (sangre oculta, menos de 0,35 mg de Fe por día). Son despreciables las cantidades que se excretan con la bilis, la orina o la transpiración normal.

Las mujeres en edad fértil tienen la pérdida adicional causada por la hemorragia menstrual, que representa un egreso promedio de unos 40 mL de sangre, lo que corresponde a algo más de 20 mg de Fe por mes. En esto hay variación individual; en algunas mujeres la pérdida puede llegar a 100 mL de sangre mensuales.

Una dieta normal contiene entre 10 y 20 mg de hierro (por día), de los cuales se absorbe en intestino del 8 al 10%, es decir, se incorpora entre 1,0 y 1,5 mg por día. El porcentaje absorbido varía según las necesidades del organismo.

Digestión. Los alimentos de origen animal contienen hierro predominantemente asociado a hemoproteínas. El Fe hemínico es aprovechado con mayor eficiencia que el no hemínico, único presente en vegetales.

La porción proteica de las hemoproteínas es degradada por proteasas digestivas. El grupo hemo liberado es soluble en el medio intestinal, especialmente en presencia de los productos de la digestión de proteínas (aminoácidos y péptidos pequeños).

El hierro no hemínico, después de la hidrólisis de las proteínas a las cuales está ligado, se encuentra en su mayor parte al estado férrico. En el medio ácido del estómago (pH 1,5), tanto el Fe^{2+} como el Fe^{3+} se mantienen solubles. Algo del Fe^{3+} puede ser convertido en Fe^{2+}, especialmente si existe ácido ascórbico (vitamina C) en el lumen. En el duodeno y en el yeyuno el contenido intestinal se alcaliniza progresivamente a medida que se incorporan las secreciones pancreáticas. El Fe^{2+} permanece en solución hasta pH 7,5-8,0, pero el Fe^{3+}, por encima de pH 5,0, forma hidróxido férrico $[Fe(OH)_3]$ que tiende a agregarse y precipitar; no es biodisponible y se elimina con las heces.

Absorción. Se puede dividir la absorción en varias fases: 1) captación en el borde en cepillo de las células de la mucosa y transporte a través de la membrana apical, 2) desplazamiento del Fe en el citoplasma hacia la membrana basolateral y 3) transferencia a la circulación.

Tanto el hierro hemínico como no hemínico son absorbidos en la porción proximal del intestino delgado; el primero con mayor eficiencia que el segundo.

1. Absorción en el borde en cepillo. El hemo atraviesa la membrana apical de los enterocitos gracias a la *proteína transportadora de hemo 1*, que lo transfiere intacto al citoplasma Una *hemoxigenasa* asociada a la membrana separa el hierro, que queda libre; la protoporfirina sigue su catabolismo independientemente para formar bilirrubina.

El hierro separado de proteínas no hemínicas en su mayor parte es Fe^{3+}, muy poco soluble y escasamente aprovechado. Tanto para el ingreso como para la salida de las células, el Fe requiere transportadores específicos y enzimas que cambien el estado de oxidación.

Si bien la captación de Fe aumenta al incrementarse la cantidad contenida en la dieta, su eficiencia disminuye, es decir, la proporción absorbida se reduce al aumentar la oferta.

Con respecto al aprovechamiento del Fe, es evidente la importancia de la composición de la dieta, pues aun cuando ésta contenga suficiente cantidad de hierro, como en algunos vegetales, la biodisponibilidad puede estar muy reducida por la presencia de agentes que obstaculizan la captación en intestino. Una dieta mixta provee factores que favorecen el ingreso de Fe y contrarrestan la acción de esos agentes. Una dieta carente de carnes, que proveen Fe hemínico y los productos de hidrólisis de proteínas, suele ser una de las principales causas de deficiencia de Fe.

Tanto el hierro procedente de hemoproteínas como el no hemínico, una vez dentro del enterocito, pasan a integrar el mismo conjunto o *pool* de Fe, con tres destinos posibles: a) transferencia a la membrana basolateral y a la circulación, b) almacenamiento, o c) utilización en la síntesis de moléculas con hierro.

Transporte hacia la membrana basolateral y a la circulación. Se realiza en unión con una proteína llamada *mobilferrina* (56 kDa). Ya se ha indicado que el Fe libre es potencialmente dañino

y siempre debe estar complejado, generalmente con proteínas.

El pasaje del hierro a la sangre a través de la membrana basolateral es mediado por *ferroportina* El metal debe ser oxidado; la conversión de Fe^{2+} a Fe^{3+} es catalizada por *hefaestina*, proteína asociada a la ferroportina que actúa como ferroxidasa. También cumple esta acción la *ceruloplasmina* del plasma. Hefaestina y ceruloplasmina son ferroxidasas que contienen cobre, esencial para su función.

Almacenamiento en la célula. El hierro no enviado a la circulación es depositado en unión a una proteína de gran tamaño (480 kDa), la *apoferritina*. Esta proteína está constituida por 24 subunidades que forman una esfera hueca en cuya cavidad central puede alojar hasta 4.500 átomos de Fe. Estos alcanzan a representar el 20% del complejo. Al captar hierro la apoferritina se convierte en *ferritina* (holoferritina), principal forma de depósito, no sólo en intestino, sino también en muchas otras células, particularmente de hígado y sistema reticuloendotelial. La absorción de hierro en intestino es modulada según las necesidades. La actividad de todos los factores que favorecen el ingreso de hierro aumenta cuando las reservas de Fe disminuyen y viceversa. En casos de mayor demanda (aumento de la eritropoyesis subsiguiente a hemorragia, hemólisis intensa, condiciones de hipoxia) se incrementan la absorción y la transferencia a la sangre.

La figura 29-3 presenta esquemáticamente el proceso de absorción de Fe en enterocitos.

Transporte en la sangre. *Transferrina.* La porción transferida al plasma es cedida a una proteína transportadora, la *apotransferrina* o *siderofilina*, glicoproteína de 80 kDa sintetizada principalmente en el hígado, que puede fijar dos átomos de hierro férrico por molécula y se convierte en *transferrina* (Tf) (holotransferrina).

La existencia de Tf en plasma y de ferritina en las células permite mantener prácticamente todo el Fe en estado complejado y evita los efectos tóxicos del hierro inorgánico libre.

El pasaje de hierro a la circulación es regulado según las reservas del organismo. Cuando éstas disminuyen, se activa el pasaje a la sangre.

En el adulto normal la concentración de hierro en plasma es de 60 a 150 µg por dL (10 a 30 µmol/L), igual para ambos sexos. La ferremia es más elevada en el recién nacido y disminuye rápidamente al cuarto mes de vida. Es notable la variación circadiana del hierro plasmático; los valores más elevados se alcanzan en las primeras horas de la mañana y disminuyen a última hora de la tarde.

No toda la transferrina del plasma está saturada con hierro. Menos de un tercio (30%) del total

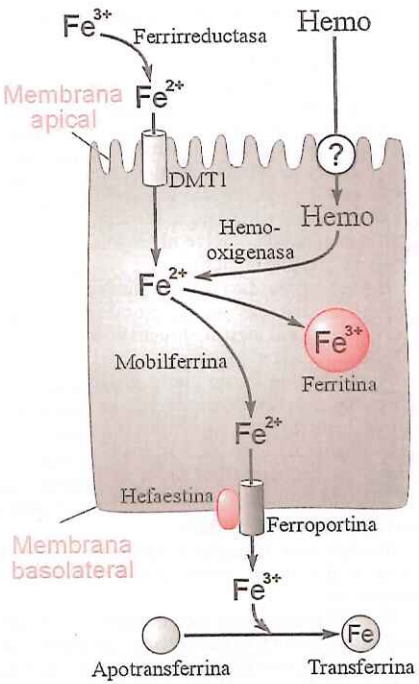


Fig. 29-3. Absorción de Fe en enterocito.

presente en el plasma está unida a dos átomos de Fe^{3+} (Tf diférrica), parte contiene un átomo (Tf monoférrica) y el resto está vacío (apotransferrina). Una medida indirecta de la cantidad de Tf se obtiene determinando la *capacidad total de fijación de hierro* del plasma. Los valores normales oscilan entre 250 y 410 µg de hierro por dL. La diferencia entre capacidad total y hierro sérico se conoce como *capacidad no saturada de fijación de hierro*, cuyo rango normal es de 140 a 280 µg por dL. La capacidad total está elevada en el embarazo y en deficiencias crónicas de hierro; disminuye en la insuficiencia de hígado (órgano que sintetiza Tf) y en la malnutrición proteica.

Transferencia a los tejidos. La transferrina se une a receptores en la membrana plasmática. Todas las células, excepto los glóbulos rojos maduros, poseen receptores para transferrina. Las células precursoras de eritrocitos son las más ricas en estos receptores.

El complejo transferrina-receptor es introducido en las células por endocitosis. La disminución del pH en el interior del endosoma favorece la liberación del Fe de su unión con la Tf y esto se

acompaña de la reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+}, que es transportado hacia el citosol a través de la membrana endosomal por un transportador idéntico al de la mucosa intestinal.

La apotransferrina permanece unida al receptor en la membrana del endosoma; cuando éste retorna a la membrana plasmática y se fusiona con ella, el complejo receptor-apotransferrina queda expuesto al espacio extracelular, donde el pH es de 7,4; el complejo se disocia, la apotransferrina es liberada, vuelve al plasma, fija nuevamente Fe y repite el ciclo.

Haptoglobina. Las células pueden captar hierro por vías distintas del receptor de transferrina. Una de ellas es el ingreso directo de hemoglobina o de hemo desde el plasma.

Normalmente existe cierto grado de lisis de eritrocitos con liberación de una pequeña cantidad de hemoglobina en el torrente circulatorio. La hemoglobina libre filtra en los glomérulos renales y se eliminaría por orina de no existir en plasma una proteína llamada *haptoglobina*, que fija específicamente Hb formando un complejo macromolecular no filtrable.

Hemopexina. Cuando se encuentra hemo libre en el plasma, es captado por otra proteína, la *hemopexina*.

El Fe liberado en el citosol puede ser almacenado en la ferritina, exportado a la circulación por la ferroportina, o utilizado para la síntesis de compuestos con Fe. Uno de los principales destinos del hierro dentro de las células, especialmente en las de la progenie eritroblástica, es la mitocondria, que contiene muchas enzimas asociadas a Fe.

Macrófagos. Otra vía de captación de hierro, cuantitativamente muy importante, es la que opera en macrófagos del sistema de fagocitos mononucleares, particularmente en el bazo, encargados de destruir los eritrocitos que han cumplido su ciclo vital. Los glóbulos rojos viejos o dañados son fagocitados y lisados por los macrófagos, la hemoglobina es degradada y el hierro, en parte, almacenado en la célula como *ferritina*. Una porción importante es exportada a través de la ferroportina para recargar la apotransferrina circulante.

Eritroblastos. Las células precursoras de eritrocitos son muy ávidas de hierro y poseen gran cantidad de receptores de transferrina en su membrana externa. Uno de los principales destinos del Fe ingresado son las mitocondrias, donde se cumple la última etapa de la síntesis de hemo.

Almacenamiento. La mayor parte del hierro en las células, principalmente de hígado, médula ósea y bazo, se une a apoferritina y es almacenada como *ferritina*. El hígado contiene alrededor del 60% de todo el hierro depositado en el organismo El resto se reparte principalmente en células del sistema reticuloendotelial de bazo y médula ósea y en enterocitos.

Ferritina plasmática. Una pequeña porción de ferritina pasa al plasma, donde su concentración guarda relación con la cantidad de Fe en depósito.

Hemosiderina. Cuando hay sobrecarga de hierro, la ferritina es parcialmente desnaturalizada por acción lisosomal, y forma gránulos de *hemosiderina*, constituidos por agregados de ferritina con un contenido total de hierro mayor que el de ésta (hasta el 50% de su masa). La ferritina y la hemosiderina son formas de depósito utilizables cuando el organismo lo requiere. Cuando el organismo necesita hierro en cantidades mayores que las habituales, por ejemplo después de una hemorragia, los depósitos de hígado y bazo son movilizados. Al consumirse estas reservas se recurre al hierro depositado como ferritina en células de la mucosa intestinal. Esto disminuye el grado de saturación de la apoferritina intestinal y activa la absorción.

Liberación de Fe de las células. En el adulto normal la cantidad de hierro ingresado a las células es equilibrada por la que se libera. El Fe es exportado de las células a través de la *ferroportina*.

Ceruloplasmina. El Fe^{2+} que llega a la circulación es oxidado a Fe^{3+} por *ceruloplasmina*, proteína plasmática que actúa como ferroxidasa. La ceruloplasmina, como la hefaestina de membrana basolateral de enterocitos, son metaloenzimas que poseen cobre como aceptor de electrones.

La figura 29-4 resume esquemáticamente los procesos mencionados.

Homeostasis del hierro. Como no se puede regular la excreción de hierro del organismo, la homeostasis de este metal depende de la modulación de la absorción en intestino, la cual se adecua a los requerimientos de la eritropoyesis; debe limitarse a cubrir la demanda sin excederla.

Las células precursoras de eritrocitos de la médula ósea, que sintetizan hemoglobina para los 200 mil millones de glóbulos rojos producidos por día, consumen la mayor cantidad de Fe. Los macrófagos del sistema reticuloendotelial son los principales proveedores del Fe. Por su parte, los hepatocitos tienen gran capacidad para almacenar Fe y cederlo según las necesidades. Debe existir una excelente coordinación entre los tejidos involucrados para asegurar que los requerimientos sean satisfechos y que no se produzca sobrecarga o almacenamiento excesivo del metal.

Hepcidina. Hormona peptídica de 25 aminoácidos, es el principal "mensajero" que establece comunicación entre los distintos efectores del sistema. Es sintetizada principalmente en hígado y liberada a la circulación cuando las reservas de

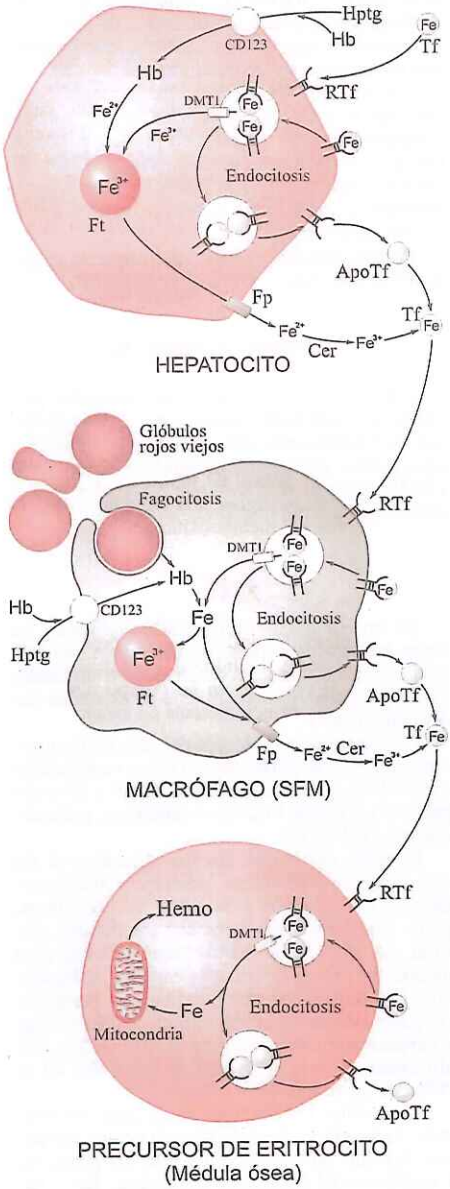


Fig. 29-4. Vías de ingreso, utilización y egreso de Fe en células muy activas en su metabolismo. Hptg: haptoglobina, Tf: transferrina, RTf: receptor de transferrina, Fp: ferroportina, Cer: ceruloplasmina, Ft: ferritina, CD123 y DMT1: transportadores.

Fe en los hepatocitos son elevadas. Su acción se ejerce principalmente sobre enterocitos y macrófagos. Disminuye la absorción e ingreso de Fe desde intestino. En macrófagos, deprime la actividad de reciclado de Fe, lo cual favorece la acumulación de Fe en la ferritina.

Excreción. El hierro se elimina del organismo por vía intestinal, no regulable. En las heces se encuentra Fe de las células descamadas del epitelio gastrointestinal, eventualmente el de sangre oculta y el correspondiente a la porción no absorbida de los alimentos. Como el Fe circula en la sangre formando complejos macromoleculares (transferrina o hemoglobina-haptoglobina), prácticamente no se excreta por orina.

Requerimientos. Sólo una pequeña proporción, aproximadamente 10% del hierro contenido en la dieta, es absorbido y llega a la circulación; el resto se elimina con las heces. Ese porcentaje puede aumentar o disminuir según las necesidades del organismo.

Se aconseja suministrar 10 mg por día en el varón adulto. Durante el crecimiento las necesidades son mayores; deben proveerse 15 mg/día en niños de 3 meses a 3 años. El recién nacido a término posee una reserva para 3 a 6 meses, almacenada principalmente en hígado durante el desarrollo fetal. Es necesario suplementar hierro en el lactante, pues la leche es muy pobre en este elemento. Los adolescentes requieren 18 mg/día; en mujeres de 12 a 50 años se aconsejan 18 mg/día, teniendo en cuenta las pérdidas menstruales; las embarazadas deben recibir más de 18 mg/día.

Deficiencia de hierro. Es un problema médico muy común, ya que constituye la más frecuente carencia nutritiva. Se calcula en más de mil millones el número de personas que la padecen en el mundo. Alcanza principalmente a individuos de los estratos sociales indigentes y pobres de los países no desarrollados, pero también a los sectores más humildes de países industrializados.

La causa más común es el aporte inadecuado de hierro dietario durante períodos prolongados. Como la forma mejor absorbida es el hierro hemínico, cuando la carne está ausente de la alimentación habitual, la disponibilidad de Fe se reduce notablemente.

Por otra parte, contribuyen a agravar el problema algunas enfermedades parasitarias que producen pérdidas continuas de sangre, como la anquilostomiasis y la esquistosomiasis, frecuentes en algunos países del llamado "tercer mundo".

Existen etapas de la vida y condiciones fisiológicas en las cuales los requerimientos de hierro aumentan notablemente y exponen a mayor riesgo de deficiencia.

Por ejemplo, durante el embarazo hay aumento del volumen de plasma con dilución de eritrocitos y reducción relativa de la concentración de Fe en sangre, a lo que se suma la gran transferencia de Fe de la madre al feto, que puede alcanzar a 3 o 4 mg por día en el tercer trimestre.

Los niños prematuros y los de muy bajo peso al nacer tienen reservas muy pobres; se producirá tempranamente deficiencia si no se agregan suplementos.

En la mujer en edad fértil las pérdidas menstruales pueden producir deficiencias si no se repone el hierro con alimentación adecuada o suplementos.

Hay situaciones patológicas que determinan fallas en la absorción de Fe en intestino: falta de ácido clorhídrico en la secreción gástrica (aclorhidria), pacientes gastrectomizados, consumo exagerado de antiácidos, síndromes de malabsorción intestinal, tránsito intestinal acelerado, avitaminosis C.

Son causa de deficiencia de hierro las pérdidas de sangre importantes (hemorragias), o de pequeñas cantidades que se mantienen durante mucho tiempo, como en las parasitosis antes mencionadas, procesos infecciosos o inflamatorios crónicos (de más de dos meses de duración), infecciones con *Helicobacter pylori* (agente asociado a úlceras gastroduodenales), neoplasias e intoxicación con plomo.

Anemia ferropriva. Cuando las reservas se agotan y falta el hierro necesario para la eritropoyesis, se afecta la síntesis de hemoglobina en las células precursoras de eritrocitos y aparecen los síntomas de anemia. La concentración de hemoglobina en sangre es baja (se consideran anormales valores menores de 12 g por dL en la mujer y de 13 g por dL en el varón). El hematocrito y el volumen corpuscular medio (VCM, volumen promedio de los góbulos rojos) disminuyen. Los eritrocitos son de tamaño más pequeño que el normal y pobres en hemoglobina (*anemia microcítica hipocrómica*).

Los pacientes tienen palidez marcada, su capacidad de trabajo está disminuida, experimentan fatiga al menor esfuerzo.

En niños carentes de Fe durante los primeros dos años de vida se producen alteraciones en el sistema nervioso central que son irreversibles, no mejoran con tratamientos ulteriores. Estos niños padecen trastornos de conducta, dificultades en el aprendizaje y reducción de la capacidad cognitiva.

Sobrecarga de hierro. La acumulación excesiva de hierro resulta de diversas causas: absorción exagerada de hierro en intestino, problemas hematológicos que requieren transfusiones repetidas (por ej., talasemia), trastornos en la síntesis de hemo que impiden la utilización de hierro, fallas genéticas que afectan a factores que intervienen en los procesos reguladores del ingreso.

La acumulación se hace inicialmente como ferritina; si la sobrecarga persiste, se va formando hemosiderina y se deposita en hígado, páncreas, piel y articulaciones (*hemosiderosis*). Estos depósitos llegan a alterar la función de los órganos afectados y son la causa del cuadro clínico llamado *hemocromatosis*.

Se han descripto varios síndromes de origen genético que causan sobrecarga de hierro.

OLIGOELEMENTOS

Constituyen un conjunto de elementos presentes en cantidades ínfimas en el organismo, con concentraciones del orden de picogramos a nanogramos por gramo de tejido húmedo. Pese a hallarse como vestigios, son esenciales para el mantenimiento del metabolismo normal.

ZINC

Es un elemento indispensable presente en todos los tejidos y líquidos del organismo. Un adulto normal contiene en su cuerpo alrededor de 2,5 g de zinc, principalmente en estado de ion divalente (Zn^{2+}).

La importancia biológica del zinc radica principalmente en su participación como componente esencial de gran número de enzimas y diversas proteínas. Cumple funciones catalíticas, estructurales y regulatorias.

Fuentes naturales. En los alimentos el Zn está asociado a proteínas, péptidos y ácidos nucleicos. Los órganos y la carne de mamíferos, pollo, pescados y mariscos son las fuentes más ricas. La leche y productos lácteos tienen algo menos; los granos de cereales enteros, las legumbres y hortalizas lo contienen, pero la presencia de fitatos reduce su biodisponibilidad. Las frutas y cereales refinados son muy pobres en Zn. Los alimentos de origen animal proveen del 40 al 70% del Zn en una dieta mixta.

Absorción. Previamente el Zn debe ser liberado de su unión con proteínas y ácidos nucleicos, función que es cumplida por las proteasas y nucleasas del tracto gastrointestinal. En el estómago, el ácido clorhídrico contribuye a esta liberación. Las secreciones pancreáticas que se vierten en el duodeno son ricas en Zn y aportan este metal al contenido intestinal.

Se absorbe a lo largo del intestino delgado, en mayor proporción en yeyuno que en duodeno e íleon. Atraviesa la membrana apical como soluto libre (Zn^{2+}). El ingreso a través del borde en cepillo se realiza por un mecanismo activo saturable. La absorción es influida por diversos factores. Es favorecida por pequeños ligandos, como los ácidos cítricos y picolínico (intermediario de la vía de triptófano a niacina), prostaglandinas, glutatión y aminoácidos libres, principalmente histidina, cisteína y glicina.

Compuestos como fitatos, oxalato y polifenoles forman con el Zn complejos no absorbibles. Los fitatos se encuentran en granos enteros y legumbres, oxalato en espinaca, chocolate y té y polifenoles (por ej. taninos) en granos enteros, frutas y té; la fibra de vegetales también tendría un efecto negativo. La presencia de alimentos de origen animal disminuye la acción inhibitoria de estos productos.

Otros cationes divalentes (Fe^{2+}, Cu^{2+}, Ca^{2+}) compiten con el Zn por su unión a ligandos y portadores.

Normalmente la absorción alcanza en promedio un 35% del total contenido en la luz intestinal y llega a 3 o 4 mg (45-60 μmoles) por día, pero se adapta a las necesidades del organismo.

Dentro del enterocito el Zn tiene varios destinos: ser utilizado por la misma célula, transportado hacia la membrana basolateral para su liberación al plasma, o almacenado en unión a proteínas. La *metalotioneína*, proteína pequeña (10 kDa) rica en restos cisteína, sirve como principal ligando para el Zn y también para otros minerales como el cobre. El Zn depositado en la metalotioneína se pierde cuando las células de las vellosidades descaman en la luz intestinal. Las dietas ricas en Zn inducen la síntesis de metalotioneína.

El Zn no almacenado ni utilizado por la célula es conducido hacia la membrana basolateral a la que atraviesa mediante transportadores específicos.

Transporte. En la sangre de la vena porta el Zn se une principalmente a albúmina, es captado por el hígado para después ser enviado nuevamente a la circulación unido a albúmina, α_2-microglobulina e inmunoglobulina G. La albúmina transporta alrededor del 70% del total de Zn en el plasma. La concentración en plasma se mantiene dentro de estrechos límites alrededor de 12 μg por dL o 10 μM. En la sangre total, el 70 a 80% es intracelular, con mayor cantidad en leucocitos que en eritrocitos.

Almacenamiento. No existe un sitio específico de depósito de Zn; se encuentra en todos los tejidos, principalmente hígado, riñón, músculo, piel y hueso. Es particularmente abundante en las secreciones de la próstata.

Excreción. La excreción con las heces representa la principal vía de salida y comprende no sólo a Zn no absorbido de los alimentos, sino además al contenido en las secreciones pancreáticas y en las células descamadas en la luz intestinal. La eliminación por orina es muy pequeña (menos de 1 mg por día).

Funciones. El zinc es componente esencial de al menos 200 enzimas, más que cualquiera de los otros microminerales. En muchas de esas enzimas participa en la reacción como parte del sitio catalítico, en otras asegura su estabilidad estructural. Algunas de las más importantes son: *anhidrasa carbónica, superóxido dismutasa, alcohol deshidrogenasa, fosfatasa alcalina, aminopeptidasa, carboxipeptidasa, ácido δ-aminolevulínico deshidratasa, colagenasa, fosfolipasa C, poliglutamato hidrolasa, transcriptasas*.

Otras funciones. Además de su participación en enzimas que catalizan reacciones clave, el Zn es necesario en una amplia gama de procesos. Es importante como componente estructural de factores de transcripción con "dedos de zinc" que interactúan con hormonas y otros agentes y se unen específicamente a elementos de respuesta en el promotor del ADN de determinados genes, activando o reprimiendo su actividad. Particularmente notables son los receptores de hormonas esteroides, tiroideas, calcitriol y retinoides. *Funciones redox*: se cumplen a través de su ya citada inclusión en la superóxido dismutasa. *Regulación de la apoptosis*. Influye sobre algunas de las etapas que desencadenan el proceso de muerte celular programada. *Control de la proliferación y crecimiento celular*. Tiene efecto directo sobre hormonas, receptores o genes responsables de su síntesis. *Estabilización de membranas*. Como factor estructural de proteínas y enzimas de membrana. *Sistema inmunitario*. Mejora la defensa contra infecciones. El zinc se asocia a gránulos de depósito de insulina en las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas y favorece su secreción.

En la saliva hay una metaloproteína con zinc, llamada *gustina*, relacionada con el proceso de captación de sensaciones gustativas.

Deficiencia de zinc. Puede deberse a ingesta insuficiente, malabsorción intestinal, pérdidas o alteraciones en la utilización del Zn. Se calcula que cerca de la mitad de la población mundial está en riesgo de deficiencia. Entre los grupos en mayor riesgo están aquellos con requerimientos aumentados, como los niños, adolescentes, embarazadas y lactantes. Los alcoholistas con cirrosis hepática frecuentemente eliminan mayor cantidad de Zn por orina (hiperzincuria) y niveles

disminuidos en plasma (hipozincemia). Los diabéticos y pacientes con infecciones también están en riesgo de deficiencia.

La reducción de Zn en el organismo es un proceso que se desarrolla lentamente debido a la eficacia de los mecanismos adaptativos que regulan su homeostasis y controlan tanto el ingreso como las pérdidas.

En la deficiencia de Zn en humanos se observan lesiones de piel, reducción del apetito, alteraciones del gusto y del olfato, defectos del crecimiento, retraso en la pubertad, hipogonadismo que se explica por la reducida sensibilidad de los tejidos "blanco" a andrógenos y estrógenos por falta de Zn en los receptores. Hay disminución de las defensas, con mayor susceptibilidad a las infecciones.

COBRE

Es un elemento ampliamente distribuido en la naturaleza. Tiene gran importancia funcional, principalmente por su participación como componente de numerosas proteínas fisiológicamente relevantes, entre ellas metaloenzimas en las que el cobre actúa como aceptor de electrones pasando del estado Cu^{2+} a Cu^{+}.

Un adulto normal contiene unos 150 mg de cobre, la mayor parte repartida en hígado, músculo, hueso, glóbulos rojos, plasma y otros tejidos.

La deficiencia dietaria no es común; sin embargo, algunas investigaciones han señalado que la insuficiencia marginal de cobre es un problema que afecta a un número relativamente importante de personas.

Fuentes naturales. Los alimentos más ricos en cobre son el hígado, mariscos, granos de cereales enteros, nueces, pasas de uva, papas, frutas y carnes. En menor concentración se encuentra en hortalizas, pollo y pescados. La leche y derivados tienen muy pequeña cantidad. La dieta promedio aporta de 2,5 a 5,0 mg por día. En las fuentes naturales la mayor parte del Cu está unido a proteínas, principalmente como Cu^{2+}.

Absorción. En general, la biodisponibilidad es del 50% del ingerido con los alimentos. La proporción absorbida es mayor con ingestas pobres, menores de 1 mg por día.

La pepsina y el ácido clorhídrico del estómago facilitan la liberación del Cu de las proteínas a las cuales está unido, acción completada por las proteasas en el intestino delgado. La absorción se realiza a lo largo del intestino delgado, especialmente en el duodeno, por transporte activo saturable.

La captación de cobre es influida por distintos factores de la dieta. Favorecida por aminoácidos libres, que ligan Cu y pueden utilizar sistemas de transporte de aminoácidos; algunos ácidos orgánicos (cítrico, láctico, málico, acético y glucónico) mejoran la absorción. Entorpecen el ingreso de Cu los fitatos, que también inhiben la absorción de Fe, Ca y Zn.

Una vez en el interior del enterocito, el Cu puede seguir diferentes caminos: a) utilización por la misma célula para la síntesis de cuproproteínas, b) transferencia a la sangre por la membrana basolateral y c) unión a *tioneína*, apoproteína que fija metales y se convierte en *metalotioneína*.

El proceso de absorción es regulado; cuando el ingreso a los enterocitos es elevado, el exceso se almacena y es eliminado con las célula exfoliadas. El Cu transferido a la membrana basolateral hace su recorrido transcelular unido a proteína, a aminoácidos o a glutatión, porque de lo contrario puede generar radicales libres y causar daño en la célula. El paso a la sangre es mediado por transporte activo.

Transporte. El cobre absorbido es vehiculizado por la vena porta en unión laxa a albúmina; también puede fijarse a aminoácidos libres, principalmente histidina y a *transcupreína* y otras proteínas de transporte.

La sangre lo distribuye a los tejidos, principalmente hepático, que lo incorporan a cuproproteínas. Una de éstas es la *ceruloplasmina*, globulina α_2 de ~160 kDa sintetizada en hígado, que fija 6 átomos de Cu por molécula. Desde el hígado, la ceruloplasmina es enviada a la circulación general. Contiene más del 80% del total de Cu presente en plasma. Participa en el metabolismo del hierro como *ferrooxidasa*, que cataliza la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+}. El resto del Cu plasmático va unido a albúmina, transcupreína e histidina.

Todas las etapas de transporte de Cu en el organismo requieren receptores, transportadores de membrana y aceptores intracelulares específicos.

Excreción. El cobre es excretado en la bilis y eliminado con las heces. La vía de excreción biliar es la más importante y contribuye a regular el contenido de Cu del organismo. La pérdida por orina es muy pequeña (unos 30 μg por día) al igual que por el sudor y las célula descamadas de la piel.

Funciones. El cobre es un cofactor esencial de muchas enzimas en las que sirve como intermediario en la transferencia de electrones. En varias proteínas y enzimas también actúa como componente estructural.

Entre las más importantes moléculas que contienen Cu se cuentan: *Ceruloplasmina, superóxido dismutasa, citocromo c oxidasa, monoamino oxidasa, p-OH-fenilpiruvato hidroxilasa, dopamina monooxigenasa, lisil oxidasa, tirosinasa, monooxigenasa peptidilglicina α-amidante*.

El *prion* (pág. 476) contiene Cu; esta proteína es importante para el funcionamiento normal del sistema nervioso. Los *factores V y VIII* son proteínas no enzimáticas que poseen Cu (intervienen en el proceso de coagulación de la sangre).

Deficiencia. La deficiencia dietaria de cobre no es frecuente, pero debe tenerse en cuenta en zonas con suelos pobres en este elemento, donde los alimentos pueden tener contenido bajo. Se la ha observado en prematuros y durante la recuperación de niños malnutridos, en pacientes con alimentación parenteral durante tiempo prolongado, en la malabsorción intestinal y en personas que consumen altas cantidades de antiácidos.

Se produce anemia microcítica hipocrómica, similar a la ferropriva, despigmentación de la piel y cabellos, desmineralización del hueso, alteraciones en la función inmunitaria, pobre mielinización. Está afectada la síntesis de catecolaminas y la degradación de serotonina, lo que puede comprometer la transmisión de estímulos nerviosos. La carencia de cobre produce trastornos neurológicos en ovinos y lesiones vasculares en porcinos y aves.

Se han descripto enfermedades genéticas relacionadas con el metabolismo del cobre, como la enfermedad de Wilson o degeneración hepatolenticular y la enfermedad de Menkes.

YODO

El yodo es un elemento requerido para la síntesis de hormonas tiroideas. Un adulto normal posee entre 20 y 50 mg de yodo distribuido en tiroides, músculos y otros tejidos. En tiroides alcanza elevada concentración, muy superior a la observada en músculo y plasma sanguíneo. El yodo molecular se representa como I_2; en la naturaleza se lo encuentra frecuentemente como yoduros (I^-) y yodatos (IO_3^-).

Fuentes naturales. La concentración de yodo en los alimentos es variable porque depende del contenido en el suelo de la región. Por eso pueden detectarse notables diferencias entre distintas zonas geográficas. El agua de mar es relativamente rica en yodo. Los pescados de mar, mariscos y algas marinas lo contienen en buena cantidad.

Absorción. El yodo de los alimentos, mayormente como yodatos o yoduros, está ligado a aminoácidos libres. La ingesta con una dieta normal es de 100 a 200 µg por día.

En el tracto digestivo el yodato es reducido a yoduro, en reacciones en las que generalmente participa glutatión. El I^- es completamente absorbido a lo largo del tracto digestivo, incluso en el estómago. La biodisponibilidad del yoduro es prácticamente 100%. Las hormonas tiroideas, tiroxina (T_4) y triyodotironina (T_3), son captadas sin cambio por la mucosa intestinal con una biodisponibilidad del 75%. Por eso es posible tratar hipotiroideos con hormona administrada por vía oral.

Transporte. El yoduro pasa a la circulación por el sistema de la vena porta y se distribuye por todo el organismo. El plasma sanguíneo contiene 4 a 8 µg por dL, en su mayor parte unido a proteínas plasmáticas (yodo proteico).

Del total absorbido, alrededor de la tercera parte es captada y concentrada en la glándula tiroides. El I^- excedente es eliminado por el riñón con la orina, principal vía de excreción.

La relación de concentraciones tiroides/plasma alcanza valores entre 30 y 40. En la tiroides los yoduros pasan desde la célula a la luz del folículo, ocupada por un material viscoso o coloide.

Metabolismo. (se considera en pág. 522).

Funciones. El único papel fisiológico del yodo conocido hasta el presente es el de ser indispensable para la síntesis de hormonas tiroideas; por eso se le atribuyen las acciones biológicas de éstas.

Deficiencia. Como el yodo es esencial para la síntesis de triyodotironina y tiroxina, la deficiencia crónica de este elemento en la dieta reduce la producción de esas hormonas y es causa de hipotiroidismo. La falta de yodo afecta a todas las etapas de la vida, desde la intrauterina hasta la vejez. Sin embargo, los grupos en mayor riesgo son las mujeres embarazadas y lactantes y niños menores de 3 años.

La deficiencia determina reducción de las reservas de yodo en tiroides y de la síntesis de T_3 y T_4. La declinación sostenida del nivel plasmático de T_4 desencadena, por retroalimentación, aumento de la secreción de TSH y de su hormona liberadora, que resultan en hiperestimulación de la tiroides. Se produce el cuadro llamado *bocio simple*, que comúnmente se debe a insuficiente ingesta de yodo y se caracteriza por agrandamiento de la glándula tiroides.

El agua de los océanos contiene yodo; las zonas costeras, hasta donde llegan los vientos marinos, poseen yodo en el suelo. Los habitantes de esas regiones tienen asegurada una buena provisión de yoduros en el agua y alimentos. En cambio, en regiones alejadas del mar o rodeadas por montañas que interceptan los vientos, suelo y agua son pobres en yodo, y suele observarse entre los pobladores alta incidencia (mayor del 10%) de bocio simple, con deficiente producción de hormonas tiroideas e hipertrofia de la glándula; es el llamado *bocio endémico*. La carencia puede subsanarse mediante el agregado de yodo

a la dieta diaria; el método más práctico de hacerlo es la adición de yoduro a la sal de cocina, en una proporción de 1 parte en 100.000. En muchos países se exige por ley enriquecer con yoduros la sal que se expende para uso culinario.

La deficiencia en el feto por falta de yodo dietario en la madre resulta en *cretinismo*, que se caracteriza por trastornos del crecimiento (enanismo) y daños neurológicos serios, con retardo mental, pérdida de la audición, trastornos motores, como espasticidad y rigidez muscular.

La falla de la glándula tiroides (hipotiroidismo) se manifiesta por diversos síntomas: disminución del metabolismo basal, reducción de la síntesis y degradación de proteínas y lípidos, aumento del colesterol sérico, disminución de la glucólisis y de la glucogenólisis, disminución de la amplitud de las ondas del electrocardiograma. El tratamiento temprano con yodo mejora estos síntomas, aunque las lesiones cerebrales prenatales son irreversibles.

Si el hipotiroidismo se inicia en la adultez, uno de los síntomas llamativos es el *mixedema*, producido por la acumulación de glucosaminoglicanos y agua en el tejido celular subcutáneo, con engrosamiento y aspecto "pastoso" de la piel.

También existen cuadros de hipotiroidismo congénito producidos por alteraciones genéticas que afectan a enzimas comprometidas en la biosíntesis de hormonas tiroideas. Es importante el diagnóstico precoz porque la falta de T_4 y T_3 en el recién nacido produce a corto plazo trastornos graves del desarrollo, especialmente del sistema nervioso.

MANGANESO

Es un elemento indispensable para muchas especies animales, entre ellas la humana. Es activador de diversas enzimas y componente de varias metaloenzimas. El hombre adulto normal contiene un total de 20 mg de manganeso en su cuerpo.

Fuentes naturales. Es provisto en la dieta principalmente por alimentos de origen vegetal. Nueces, granos de cereales enteros, verduras y el té son buenas fuentes; la harina blanca tiene mucho menos que el trigo entero. Carnes, pescado y productos lácteos también lo contienen, aunque en menor cantidad. La dieta promedio provee unos 2 a 9 mg por día, lo cual cubre los requerimientos normales.

Absorción. El manganeso se absorbe a todo lo largo del intestino delgado.

Diversos factores influyen la absorción; es aumentada por ligandos de bajo peso molecular, como histidina y citrato. La fibra, fitatos y oxalato forman precipitados no absorbibles con el manganeso.

Transporte. Desde el intestino pasa a la sangre de la vena porta, donde puede permanecer libre como Mn^{2+} o unido a α_2-macroglobulina y albúmina hasta ser captado por el hígado. En los hepatocitos tiene varias alternativas: ser excretado con la bilis, incorporado a enzimas, o enviado a la circulación. No se conoce bien el mecanismo por el cual ingresa a las células.

No se almacena en el organismo, pero su concentración es mayor en el hueso, que contiene alrededor del 25% del total de Mn, principalmente asociado a la hidroxiapatita. Otros órganos que poseen manganeso son el hígado, los riñones, el páncreas y el pelo.

Excreción. La casi totalidad del Mn no utilizado es excretado por el hígado con la bilis y se suma al exceso no absorbido de la dieta para ser eliminado con las heces.

Funciones. La importancia funcional del Mn se debe a su papel como activador de enzimas o como constituyente de metaloenzimas. Entre las enzimas con las cuales está relacionado se encuentran representantes de todas las clases: oxidorreductasas, hidrolasas, mutasas, transferasas, liasas, ligasas. Sin embargo, la activación no es muy específica, ya que el Mn puede ser reemplazado por otros cationes divalentes, como el Mg^{2+}. Las únicas que son dependientes específicamente de Mn son las *glicosiltransferasas*, la *glutamina sintetasa* y la *farnesilpirofosfato sintetasa*. Las metaloenzimas con Mn son la *superóxido dismutasa* mitocondrial, la *arginasa* y la *piruvato carboxilasa*.

Deficiencia. Se la observa muy raramente; sólo se produce en humanos si se suprime totalmente la ingesta de Mn en la dieta. Los principales síntomas son náuseas, vómitos, dermatitis, disminución del crecimiento de pelos y uñas, cambios en la pigmentación del cabello. También se han descrito alteraciones en las funciones de reproducción, en la tolerancia a la glucosa, en el metabolismo de lípidos, disminución de colesterol en plasma. Se producen fallas en la síntesis de oligosacáridos, glicoproteínas y proteoglicanos, como expresión de actividad reducida de glucosil transferasas.

SELENIO

El selenio (Se) es un oligoelemento esencial en humanos. Por su similitud con el azufre puede reemplazar a éste en los aminoácidos metionina, cisteína y cistina formando selenoaminoácidos que se integran en la estructura primaria de diversas proteínas, algunas con actividad enzimática, a

través de las cuales está implicado en diversas e importantes funciones. El contenido en un adulto normal abarca un amplio rango, de 3 a 15 mg, según las zonas geográficas.

Fuentes naturales. El contenido de selenio de los alimentos depende del existente en el suelo y varía notablemente en distintas regiones. Los productos de origen animal tienen, en general, más selenio que los vegetales. Se encuentra incluido en compuestos orgánicos, principalmente en proteínas, ya sea como selenocisteína, que predomina en los alimentos procedentes de animales, o como selenometionina, más abundante en los vegetales. También puede existir en compuestos inorgánicos, selenito (SeO_3^{2-}) o selenato (SeO_4^{2-}). Las mejores fuentes son los pescados de mar, mariscos y las castañas cajú de Brasil.

Absorción. Después de la digestión de las proteínas que los contienen, los aminoácidos con Se son transferidos al interior de los enterocitos por los mismos sistemas que transportan a los correspondientes aminoácidos azufrados.

Transporte. Al llegar a la vena porta, el Se se une a proteínas del plasma, principalmente lipoproteínas de muy baja y baja densidad (VLDL y LDL), y es distribuido a los tejidos. El hígado contiene más del 30% del total; 30%, los músculos; 15%, los riñones; 10% circula en el plasma. En éste, la mayor parte (60 a 80%) es vehiculizada por la *selenoproteína* P.

Metabolismo. Los selenoaminoácidos pueden permanecer en la célula formando parte del "*pool*" general de aminoácidos. La selenometionina procedente principalmente de los vegetales de la dieta no es distinguida por los mamíferos de su análogo azufrado; es metabolizada e incorporada en proteínas por las mismas vías que la metionina.

El selenio libre es convertido en selenuro de hidrógeno (H_2Se) con H donado por glutatión y en selenofosfato por la *selenofosfato sintetasa*, que transfiere fosfato de ATP. El selenofosfato es el compuesto intermediario en la biosíntesis de selenoproteínas. En animales, estas proteínas contienen predominantemente selenocisteína; su biosíntesis utiliza un ARNt especial que inicialmente une el aminoácido serina. Por un proceso que requiere selenofosfato, la serina fijada al ARNt se convierte en selenocisteína. El codón UGA, que generalmente indica terminación, cuando coexiste en el ARNm con una secuencia específica de la porción 3' no traducida, induce la inserción del ARNt cargado con selenocisteína.

Excreción. El selenio se excreta por partes iguales por orina y por las heces. La excreción urinaria es el principal mecanismo de control homeostático.

Funciones. El Se es componente de proteínas, gran parte de ellas con actividad enzimática. Se han identificado 25 genes de selenoproteínas en el genoma humano, pero hasta el presente se han caracterizado sólo 15 de ellas. La concentración de selenoproteínas en glándulas del sistema endocrino (tiroides, adrenales, hipófisis, testículo, ovario) es más alta que en otros órganos.

Las selenoproteínas mejor conocidas son las *Glutatión peroxidasas (GSPx)*. Existen 5 isozimas que intervienen en la remoción de peróxido de hidrógeno y de otros peróxidos. La glutatión peroxidasa forma parte del sistema antioxidante del organismo (ver cap. 10). *Tiorredoxina reductasas*. Flavoenzimas dependientes de NADPH, con selenocisteína en su sitio catalítico. *Yodotironina desyodasas*. Selenoenzimas que participan en el metabolismo y mantenimiento de los niveles de hormonas tiroideas (pág. 522). Además *selenofosfato sintetasa*, *selenoproteína P*, y *selenoproteína de espermatozoides*, que resulta de la transformación de una de las glutatión peroxidasas.

Deficiencia. Ha sido descrita en pacientes con alimentación parenteral durante tiempo prolongado. Produce dolor y debilidad muscular, pérdida de la pigmentación del pelo y piel. En niños hay retraso del crecimiento y desarrollo que se deben a fallas en el metabolismo de las hormonas tiroideas.

Algunos estudios han mostrado que la deficiencia de selenio se correlaciona con una mayor incidencia de neoplasias, sobre todo cáncer de próstata.

MOLIBDENO

Es un elemento de transición que en el organismo se encuentra generalmente unido a S u O, en dos estados de oxidación, Mo^{+4} y Mo^{+6}. El molibdeno es un elemento esencial; es biológicamente inactivo, al menos que esté unido a un núcleo pterina formando un cofactor semejante al ácido fólico, la *molibdopterina,* indispensable para la actividad de varias enzimas.

Fuentes naturales. Está ampliamente distribuido en los alimentos comunes, pero el contenido varía según la concentración de Mo en el suelo. Son buenas fuentes las legumbres, vísceras sólidas (hígado y riñón), granos de cereales enteros, carne y pollo. El contenido en las carnes está relacionado con el del forraje que consumen los animales. La dieta promedio cubre los requerimientos diarios.

Absorción. El molibdeno se absorbe en todo el tracto gastrointestinal, en mayor proporción en las porciones proximales del intestino delgado.

Transporte. Desde los enterocitos pasa a la circulación, donde es transportado como molibdato (MoO_4^{2-}) unido a albúmina y α_2-macroglobulina. También se fija laxamente en los eritrocitos. El hígado y los riñones son los órganos que lo retienen en mayor proporción.

En rumiantes que pastan en zonas contaminadas con Mo procedente de actividades industriales o mineras se produce deficiencia de cobre.

Excreción. La mayor parte se excreta como molibdato en la orina, en cantidad relacionada directamente con la ingesta. También es eliminado con la bilis. La homeostasis del Mo depende más de la regulación de la excreción que de la absorción.

Funciones. El Mo, integrando la molibdopterina, se une al sitio activo de tres hidroxilasas: *sulfito oxidasa*, *xantina oxidasa/deshidrogenasa* y *aldehído oxidasa*.

Deficiencia. Es muy rara su observación en el hombre; podría darse en casos de ingestión prolongada de dietas con altas concentraciones de sulfato, cobre o tungsteno. En los habitantes de zonas con muy bajo contenido de Mo en el suelo, se ha descrito aumento de la incidencia de cáncer de esófago.

FLÚOR

Si bien en sentido estricto no es un elemento indispensable para el ser humano, se ha comprobado que el flúor (F), en muy bajas concentraciones, tiene efectos beneficiosos como protector contra la desmineralización de tejidos calcificados. Hasta el presente no existen evidencias que permitan incluirlo como factor esencial en la dieta. Es nocivo cuando su ingesta excede 10 mg por día.

Fuentes naturales. Son ricos en flúor el té y los pescados de mar si se los consume con esqueleto. Existe en baja cantidad en los alimentos comunes, donde su concentración varía según la riqueza del suelo del cual provienen. Se lo encuentra en la naturaleza como fluoruros unidos a metales, a no metales, o a compuestos orgánicos, incluso proteínas.

En los países en los cuales se practica la fluoración del agua corriente en concentraciones que varían entre 37 y 63 mM (0,7 a 1,2 mg/L), ésta es la principal fuente. En este caso, el aporte diario puede ser de 1,4 a 3,4 mg por día.

Absorción. Se realiza en todo el tracto gastrointestinal y es muy rápida.

Funciones. El flúor influye sobre la mineralización de huesos y dientes. Al parecer promueve la precipitación de Ca y fosfato para formar la estructura cristalina de hidroxiapatita. Puede ser incorporado a la estructura de ésta en reemplazo de OH^-, lo que ocurre tanto durante la formación inicial del cristal o en el hueso ya formado. La proteína de la matriz osteoide tiene alta afinidad por el fluoruro.

Se ha observado que la osteoporosis, proceso de descalcificación de los huesos muy común en personas de edad, es mejorada por el consumo de fluoruro en cantidades moderadas.

En lo que respecta a los dientes, la fluorohidroxiapatita, menos soluble en ácido que la hidroxiapatita, los hace más resistente a la caries. Además el F^- tiene acción inhibitoria sobre bacterias de la placa dental.

Hace muchos años se había demostrado que la presencia de fluoruros en el agua de bebida, en una concentración de 1 mg por litro (una parte en un millón), tiene acción preventiva de la caries dental. La fluoración del agua ha producido un descenso notable en la incidencia de caries dental.

Toxicidad. La ingesta crónica de cantidades mayores que las recomendadas produce *fluorosis*. En algunas regiones de la tierra, el agua de consumo contiene más de 4 mg por litro de fluoruros. La ingestión prolongada de tales cantidades de flúor tiene efectos tóxicos. Se produce un cuadro de *fluorosis*, en el que se presentan alteraciones en hueso, riñón y posiblemente músculos y sistema nervioso. Hay lesiones cutáneas, con tendencia a la formación de cáncer de piel. Sobre todo en niños en edad de desarrollo de las piezas dentarias se producen cambios en los dientes, que presentan manchas blancas opacas, también vetas color marrón y se quiebran con facilidad.

El fluoruro tiene acción inhibitoria sobre varias enzimas, entre ellas la enolasa, razón por la cual puede bloquear la glucólisis.

COBALTO

El cobalto no es un elemento esencial en humanos; es componente de la cobalamina o vitamina B_{12} que sí es esencial (pág. 602), e ingresa preformada con los alimentos. El Co libre no es utilizado por el organismo.

RESUMEN

Sodio. Del total de Na^+ en un adulto, 55 % se encuentra en el líquido extracelular (LEC), 40% en el hueso y el resto dentro de las células; en el plasma su concentración es 135 a 145 mEq/L; en las células, 10 mEq/L. El Na^+ es responsable de la mitad de la osmolaridad del LEC. La principal vía de eliminación es el riñón. La aldosterona activa su reabsorción en los túbulos y el péptido natriurético atrial la inhibe.

Potasio. El 90% del total se encuentra en el espacio intracelular, donde su concentración es de 150 mEq/L. La secreción de K^+ en los túbulos distales es activada por aldosterona.

Cloruro. Principal anión del LEC, en el cual se encuentra 88% del total. En plasma, 102 mEq/L. Las variaciones en el contenido de Cl^- son paralelas a las de Na^+.

Calcio. 99% del total se encuentra en tejido óseo; la concentración en plasma, 10 mg/dL (2,5 mM o 5 mEq/L), de los cuales 50% están como Ca iónico, el resto se halla unido a proteínas o en compuestos no ionizables de pequeña masa. El Ca^{2+} es la forma fisiológicamente activa. Cuando el pH aumenta (alcalosis) el Ca^{2+} disminuye y viceversa. El hueso es un extenso reservorio de Ca^{2+}. Adultos y niños de 1 a 10 años necesitan 800 mg de Ca^{2+} por día; lactantes, 350 a 550 mg; mujeres durante embarazo y lactancia, 1.200 mg. La leche y productos lácteos son las mejores fuentes. Su absorción en intestino se adapta a las necesidades. La homeostasis del Ca^{2+} depende principalmente de la hormona paratiroidea y de 1,25-$(OH)_2$-D_3. La concentración intracelular de Ca^{2+} es muy baja (0,1 µM). Diversos estímulos actúan sobre receptores de membrana y promueven la apertura de canales de Ca^{2+}. El Ca^{2+} que ingresa en el citosol es expulsado por Ca^{2+}-ATPasa e intercambiadores Na^+/Ca^{2+} de membrana plasmática. También penetra Ca^{2+} al citosol desde el retículo endoplásmico y mitocondrias. Numerosas proteínas se unen al Ca^{2+} y actúan como efectoras de diversas acciones. La disminución del Ca^{2+} extracelular por debajo de 3,5 mg/dL aumenta la excitabilidad neuromuscular (tetania). La pérdida prolongada de Ca^{2+} es causa de osteoporosis.

Fósforo. Más del 80% del total se encuentra en hueso, principalmente en forma de hidroxiapatita. En LEC está en parte como aniones fosfato (HPO_4^{2-}/HPO_4^-); la concentración en plasma es de 2,5 a 4,8 mEq/L. Se absorbe en yeyuno e íleon en un proceso dependiente de 1,25-$(OH)_2$-D_3. Una relación Ca:P de 2:1 en los alimentos favorece la absorción. La reabsorción de fosfatos en túbulos renales es activada por calcitriol e inhibida por hormona paratiroidea.

Magnesio. En plasma 1,5 a 3,0 mg/dL (0,625 a 1,25 mM o 1,25 a 2,5 mEq/L), 30% unido a proteínas. Es el segundo catión del LEC. Esencial en muchas reacciones enzimáticas. Forma complejos con ATP y otros nucleótidos trifosforados. Tiene influencia sobre la excitabilidad neuromuscular.

Hierro. Un adulto posee de 4 a 4,5 g, de los cuales 2,6 a 3,0 g están en la Hb, 1,0 a 1,5 g en complejos de almacenamiento (ferritina y hemosiderina) y 0,5 a 1,5 g en otros compuestos. Se catabolizan de 8 a 9 g de Hb por día, lo cual representa 25 mg de Fe; 95% de esta cantidad (24 mg) se reutiliza. Un adulto pierde 1 mg de Fe por día; en la mujer se agrega la pérdida por las hemorragias menstruales. Los alimentos de origen animal contienen hemoproteínas cuyo Fe se absorbe más fácilmente que el contenido en vegetales. Para la absorción de Fe es importante la presencia de HCl en jugo gástrico y de ácido ascórbico. Se aconseja proveer 10 mg por día en el adulto y algo más en embarazadas, niños y adolescentes. El Fe se absorbe en estado ferroso; la captación en la mucosa es proporcional a las necesidades. En el interior del enterocito el Fe puede ser transferido a membrana basolateral y a la circulación o almacenado en la célula como ferritina. El pasaje de Fe a la circulación es mediado por ferroportina previa oxidación a Fe^{3+} catalizada por hefaestina. El transporte en el plasma está a cargo de transferrina, a la cual se une previa oxidación mediada por ceruloplasmina. El pasaje a la circulación es regulado por las reservas de Fe del organismo. El nivel normal en plasma es de 60 a 150 µg/dL. La transferrina se une a receptores de membrana y es introducida en las células por endocitosis. El Fe es liberado en el citosol y almacenado como ferritina. Los macrófagos fagocitan los eritrocitos que han cumplido su ciclo vital y captan el Fe de la Hb degradada. Este hierro es almacenado como ferritina o exportado por la ferroportina. Cuando hay sobrecarga de Fe se forman gránulos de hemosiderina. Hepcidina es un péptido pequeño que contribuye a la homeostasis. El Fe se elimina por vía intestinal. La falta de Fe en la alimentación produce anemia microcítica hipocrómica.

Oligoelementos. Zinc. Presente en alimentos de origen animal. Se absorbe principalmente en yeyuno; en el enterocito se fija a metalotioneína. En el plasma es transportado unido a albúmina. Se excreta por jugo pancreático. Es constituyente de muchas enzimas. La deficiencia produce retardo del desarrollo, anemia e hipogonadismo. **Cobre.** Un adulto tiene un total de 150 mg, 50% en músculos y hueso, 10% en hígado. El Cu es componente de enzimas como citocromo oxidasa, superóxido dismutasa, monoaminooxidasa, tirosinasa, ceruloplasmina. Su deficienciencia es causa de anemia. **Yodo.** Requerido para la síntesis de hormonas tiroideas. Se absorbe en intestino como yoduro. La tiroides capta una tercera parte del total absorbido, lo oxida por acción de peroxidasa y lo incorpora en residuos tirosina de tiroglobulina, de la cual se liberan las hormonas T_4 y T_3. La deficiencia crónica de yodo en la dieta produce hipotiroidismo (bocio endémico). **Manganeso.** Provisto principalmente por alimentos de origen vegetal. Es requerido como cofactor por varias enzimas. **Molibdeno.** Integra varias metaloenzimas. **Selenio.** Componente de selenocisteína y selenometionina. Se encuentra en glutatión peroxidasa, yodotirosina desyodasas, tiorredoxina reductasa y selenofosfato sintetasa.

BIBLIOGRAFÍA

Blanco, A (2009). *Micronutrientes. Vitaminas y Minerales*. Editorial Promed, Buenos Aires.

Bowman B.A., Russell R.M. (eds.). (2003), *Conocimientos Actuales sobre Nutrición*. 8va Edición, Organización Panamericana de la Salud, Washington.

DiSilvestro R.A. (2005). *Handbook of Minerals as Nutritional Supplements*, CRC Press, Boca Raton.

Preuss H.G. (2003). Sodio, cloruro y potasio. En: Bowman B.A., Russell R.M. (eds.). *Conocimientos Actuales sobre Nutrición*, 8va Edición, pp. 330-339.

Sareen S. Gropper, Smith J.L., Groff J.L. (2005). *Advanced Nutrition and Human Metabolism*, 4th Edition, pp. 402-407.

Shils M.E., Shike M., Ross A.C., Caballero B., Coussins R.J. (eds.) (2006). *Modern Nutrition in Health and Disease*, 10th Edition, pp. 194-210, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia.

World Health Organization, Food and Agricultural Organization of the United Nations. (2004). *Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition*, 2nd Edition, pp. 59-93, WHO, FAO, Geneva.

CAPÍTULO 30

Bases moleculares de la inmunidad

SISTEMA INMUNITARIO

Todo individuo está expuesto a la invasión de agentes potencialmente patógenos (virus, bacterias, protozoarios, hongos), contra los cuales normalmente se dispone de sistemas de defensa.

Se reconoce la existencia de dos de esos sistemas: a) *innato*, presente en todos los seres vivos desde el nacimiento, antes de todo contacto con agentes extraños. Es inespecífico y no requiere experiencia previa, b) *adaptativo*, desarrollado en vertebrados; se perfecciona después de un primer encuentro con el invasor. A diferencia del primero, es específico, adaptable y tiene capacidad de memoria. El primer contacto con un "intruso" es registrado por el sistema y, en posteriores encuentros, lo reconocerá y producirá una reacción más rápida, intensa y eficaz que la primera.

SISTEMA INNATO

En primer lugar deben considerarse componentes de este sistema a la piel y los epitelios de revestimiento de los tractos respiratorio y gastrointestinal, cuya integridad representa una barrera contra el ingreso de gérmenes desde el exterior. Si estos agentes pueden sortear este primer obstáculo, una segunda línea de defensa, representada por diversas células, mediadores químicos y proteínas microbicidas procurarán la destrucción del invasor.

Entre las células del sistema innato se cuentan neutrófilos, macrófagos, células "matadoras" naturales que la literatura inglesa designa con las siglas NK, de *natural killer*, y células dendríticas.

Neutrófilos y macrófagos. Estos fagocitos poseen en su superficie receptores y otras moléculas que reconocen componentes comunes en muchos microorganismos, tanto protozoarios como hongos, bacterias y virus. Utilizan principalmente receptores TLR.

Receptores TLR (de *toll-like receptor*, que puede traducirse como receptores de control de paso o peaje). En humanos se han descrito once TLR diferentes que se expresan no sólo en macrófagos y neutrófilos sino también en células epiteliales, endoteliales y dendríticas. Los TLR poseen un primer segmento extracelular al cual se une el ligando, otro en hélice α transmembrana y un tercer dominio citoplasmático que se asocia a sistemas de transducción de señales.

Los TLR reconocen como ligandos a lipopolisacáridos y lipopéptidos presentes en la pared de muchas bacterias, a ARN de doble hebra de algunos virus, ADN no metilados, restos formilmetionina en proteínas de bacterias, etc.

Cuando un ligando se une a la porción externa del receptor éste se dimeriza y sufre un cambio conformacional que lo capacita para atraer proteínas adaptadoras, entre ellas MyD88 (de *myeloid differentiation factor 88*) y TRIF (de *toll-like receptor associated activator of interferon*). Con la fijación de estas proteínas se activan quinasas y se inicia una cascada de fosforilaciones que finalmente induce la síntesis de *citoquinas*. La vía dependiente de la proteína MyD88 activa el *factor nuclear de transcripción-κB* (NF-κB), que determina la liberación de citoquinas inflamatorias. Las principales citoquinas del sistema innato incluyen el factor de necrosis tumoral (TNF), la IL-1 y quimioquinas (ver más adelante).

En algunos casos, estos agentes promueven y mantienen un proceso inflamatorio que tiende a la eliminación del microorganismo invasor; en otros, determinan la producción de *interferón* (IFN) (pág. 688), que procura anular la acción de virus.

La vía mediada por TRIF activa el factor de transcripción IRF-3 que controla la producción de interferón β. Éste, a su vez, actúa sobre sus receptores, que activan proteínas STAT (pág. 500) y estimulan la producción de citoquinas.

Hay interacción o *crosstalk* (pág. 503) entre estos sistemas de señales; participan también proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (pág. 499) que favorecen la liberación de citoquinas.

Por otro lado, la unión de algunos ligandos a TLR puede provocar inflamación no séptica (sin infección) que explica la producción de enfermedades autoinmunes no dependientes de autoanticuerpos o células T autorreactivas. Entre estas condiciones patológicas se incluyen la artritis reumatoidea, la espondilitis anquilosante, la psoriasis y otras.

Lectinas. También contribuyen al reconocimiento moléculas tipo *lectina* que fijan carbohidratos, principalmente manosa, comunes en polisacáridos de superficie de muchos microorganismos.

Células NK ("matadoras"). Participan en la destrucción de células infectadas que contienen gérmenes en su interior. Inducen la producción de interferón γ, activan macrófagos y promueven la destrucción de esas células. El reconocimiento de éstas por las NK es regulado por una combinación de receptores.

Células dendríticas. Son derivadas de células precursoras de la médula ósea, relacionadas con los fagocitos mononucleares. Poseen receptores que detectan la presencia de microbios o células infectadas por virus, lo que genera la producción de citoquinas, entre ellas interferones (pág. 688).

Quimioquinas. Se cuentan entre las citoquinas liberadas por células del sistema, principalmente macrófagos. De acción quimiotáctica sobre leucocitos circulantes, atraen y reclutan a éstos, favorecen su adhesión a las paredes del endotelio vascular y estimulan su migración hacia el sitio de infección a través de las paredes vasculares.

La convergencia de todos estos factores en el sitio de infección inicia la reacción inflamatoria. Los fagocitos engloban los gérmenes y partículas extrañas, que son degradados por enzimas hidrolíticas de lisosomas y por las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno liberadas durante la "explosión respiratoria" que ocurre en las células efectoras activadas.

También se dispone de moléculas circulantes de acción microbicida entre las que se cuentan las de la familia de las *pentraxinas* (por ejemplo, la proteína C reactiva), las *colectinas*, que actúan como lectinas y las *ficolinas*.

Deben considerarse también como integrantes del sistema innato a las proteínas del *complemento* (ver pág. 675), especialmente la llamada "vía alternativa", activada por la presencia de microorganismos.

El complemento, así como otros factores que actúan en el sistema innato, también participan en las acciones del sistema adaptativo.

En muchos casos la reacción del sistema innato contribuye a potenciar la del sistema adaptativo y a aumentar notablemente la eficacia de la respuesta.

Si el invasor rebasa las barreras del sistema innato entran en juego las del sistema adaptativo.

SISTEMA ADAPTATIVO

INMUNIDAD HUMORAL

Los principales componentes del sistema inmunitario adaptativo son linfocitos que específicamente reconocen y responden ante la presencia de microorganismos, partículas o moléculas invasoras. Se reconocen dos tipos de estos linfocitos, designados B y T. Circulan en la sangre y linfa, se encuentran concentrados en los órganos linfoideos y están distribuidos prácticamente en todos los otros tejidos.

Linfocitos B y T. Los linfocitos B están relacionados con la producción de anticuerpos o inmunoglobulinas. Como los anticuerpos se liberan en los espacios extracelulares, se dice que los linfocitos B están vinculados con la *inmunidad humoral*. Los linfocitos T, en interacción con otras células, promueven la eliminación del agente invasor. Participan en la llamada *inmunidad celular*.

Ambos tipos de linfocitos se originan en la médula ósea a partir de células de la progenie linfoblástica. Los linfocitos B permanecen en ese órgano hasta su maduración total; en cambio, los precursores de los linfocitos T pasan al timo, donde sufren un proceso de diferenciación que los convierte en células T maduras.

Una vez completada su maduración, tanto los linfocitos B como los T ingresan en la circulación y se dirigen al bazo, ganglios linfáticos, amígdalas y otros acúmulos de tejido linfoide. En general, es en estos órganos donde se inician las respuestas inmunes.

Durante su diferenciación, los linfocitos presentan proteínas distintivas en su superficie. Un grupo de estas proteínas, designadas con las letras CD (del inglés *cluster of differentiation*) seguidas de un número, se utilizan como "marcadores" para establecer el tipo de célula y el estadio de maduración en el cual se encuentra, ya que aparecen o desaparecen en etapas definidas de su ontogénesis.

Antígeno. El término *antígeno* designa a todo agente que, reconocido por los elementos adaptativos del sistema (linfocitos B o T), desencadena una respuesta inmunitaria. Los virus, bacterias, protozoarios y hongos, mencionados como posibles agresores, son inmunogénicos. También actúan como tales células o macromoléculas de individuos de otra especie, o aun de otros individuos de la misma especie y células tumorales del mismo sujeto.

En condiciones normales, el sistema reconoce como antígenos agentes cuyas moléculas constituyentes poseen diferencias estructurales con las del propio organismo. En otros términos, discrimina entre los componentes del individuo y los ajenos a éste.

Epitopo. En realidad, no es la totalidad del microorganismo, célula o macromolécula extraña la responsable de la reacción inmunitaria. El sistema reconoce específicamente porciones relativamente pequeñas de aquellos, denominadas *determinantes antigénicos* o *epitopos* (o *epitopes*). Un microorganismo, célula o macromolécula puede presentar uno o múltiples epitopos.

Macromoléculas como proteínas y heteropolisacáridos son antigénicas en la medida en que presenten diferencias estructurales con las constituyentes de los tejidos del propio individuo. Los segmentos de esas macromoléculas pasibles de ser reconocidos como "foráneos" por el sistema inmunitario se comportan como determinantes antigénicos o epitopos.

Cinética de la respuesta inmune

Cuando el sistema inmunitario tiene su primer contacto con un antígeno, se produce la *respuesta primaria*, que se manifiesta aproximadamente al quinto día por la aparición en el plasma de anticuerpos del tipo IgM (pág. 664) específicos contra el antígeno. Pocos días después aparecen también IgG de igual especificidad. La concentración de IgM disminuye rápidamente, mientras la de IgG continúa en aumento hasta llegar a un máximo a los 10 o 15 días del ingreso del antígeno. El nivel de anticuerpos se mantiene durante 15 a 20 días más, transcurridos los cuales empieza a descender lentamente. Después de 4 meses, la concentración de Ig específicas en plasma sanguíneo se reduce a valores muy bajos (fig. 30-1 A).

Si después de varios meses o años se vuelve a producir el ingreso del mismo antígeno, tiene lugar la *respuesta secundaria*, con características diferentes de la primaria: a) la aparición de anticuerpos es evidente ya al tercer día; b) el aumento de Ig en el plasma es mucho más rápido, su concentración alcanza niveles hasta 100 veces más elevados y se sostiene durante un tiempo notablemente más prolongado (fig. 30-1 B); c) las Ig que predominan desde el comienzo son de tipo

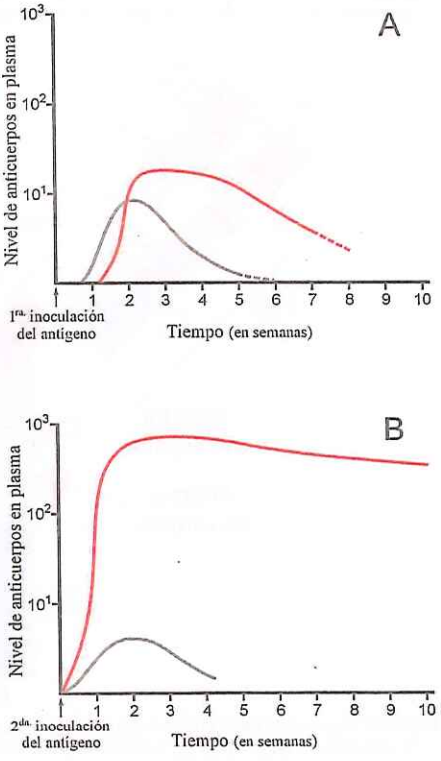


Fig. 30-1. Cinética de la aparición de inmunoglobulinas (IgM en gris, IgG en rojo) en plasma sanguíneo en respuesta al ingreso de un inmunógeno. Se representa el nivel de anticuerpos en función del tiempo transcurrido desde la inoculación del agente extraño. **A.** Primer contacto del antígeno con el sistema inmunitario (respuesta primaria). **B.** Segundo encuentro, seis meses después del inicial (respuesta secundaria).

IgG y tienen mayor afinidad por el antígeno que las producidas en la respuesta primaria.

Las causas de esta evolución de los niveles de anticuerpos plasmáticos y de las diferencias entre respuesta primaria y secundaria serán analizadas más adelante.

Estructura de las inmunoglobulinas

Para todas las clases de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE) (págs. 61 y 662), la unidad estructural es semejante; están constituidas por cuatro cadenas polipeptídicas dispuestas espacialmente en forma simétrica; el conjunto semeja una letra Y (fig. 30-2). Si bien ésta es la conformación básica de la unidad para todas las Ig, existen diferencias entre distintos tipos de anticuerpos. La tabla 30-1 resume características de las cinco clases de inmunoglobulinas. La descripción siguiente corresponde a la IgG.

Dos de las cadenas, idénticas entre sí, tienen mayor masa, razón por la cual se las designa *pesadas* o H (del inglés *heavy*). Poseen unos 440 restos aminoacídicos cada una; su masa es de alrededor de 50 kDa. Las otras dos subunidades, iguales entre sí, formadas por unos 220 aminoácidos, de masa próxima a 25 kDa, son denominadas *livianas* o L.

Las cuatro cadenas se mantienen unidas mediante puentes disulfuro (enlaces -S-S- intercatenarios) e interacciones no covalentes (fig. 30-2). Cada una de las subunidades tiene zonas o dominios de similar estructura secundaria y terciaria.

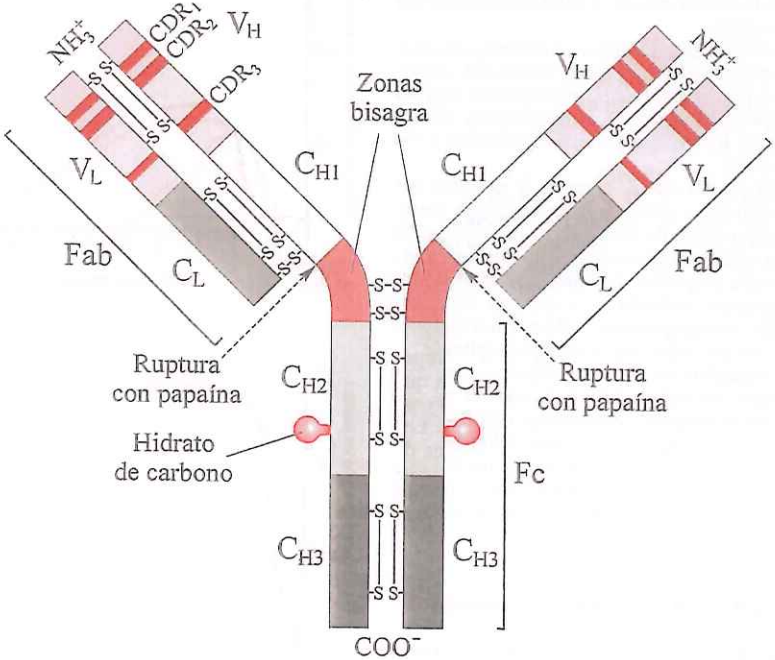


Fig. 30-2. Esquema de una unidad estructural de IgG. La unidad es simétrica y las cadenas constituyentes (2L, livianas y 2H, pesadas) se unen entre sí por puentes disulfuro. Cada subunidad tiene un dominio variable (V_L para las livianas, V_H para las pesadas). Las zonas transversales en rojo en las regiones variables (CDR_1, CDR_2 y CDR_3) corresponden a los segmentos hipervariables. Los dominios constantes (C_L para las livianas, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3} para las pesadas) y los variables poseen enlaces S–S intracatenarios. Entre C_{H1} y C_{H2} se extiende la región *bisagra*. A los dominios C_{H2} se unen carbohidratos. El tratamiento con papaína separa tres fragmentos: dos Fab, cada uno formado por una cadena L completa y un trozo de cadena H que comprende los dominios V_H y C_{H1}. La cadena L y el trozo de H están unidos por un puente disulfuro. En la porción N-terminal de este fragmento Fab se encuentra el sitio de unión del antígeno. El fragmento restante, llamado Fc, está constituido por las porciones C_{H2}, C_{H3} y las zonas bisagras de ambas cadenas H, unidas por enlaces S–S.

Tabla 30-1. Inmunoglobulinas.

Clase	Masa (kDa)	Coeficiente Sediment. (S)	Concentr. en plasma (mg/dL)	Concentr. en plasma %	Cadenas livianas	Cadenas Pesadas	Estructura
IgG	150	7	1.250	75,6	κ o λ	γ	$\kappa_2\gamma_2$ o $\lambda_2\gamma_2$
IgA	150-600	7-13	250	15,1	κ o λ	α	$(\kappa_2\alpha_2)_n$ o $(\lambda_2\alpha_2)_n$
IgM	950	18-20	130	7,9	κ o λ	μ	$(\kappa_2\mu_2)_5$ o $(\lambda_2\mu_2)_5$
IgD	180	7	20	1,2	κ o λ	δ	$\kappa_2\delta_2$ o $\lambda_2\delta_2$
IgE	180	8	3	0,2	κ o λ	ε	$\kappa_2\varepsilon_2$ o $\lambda_2\varepsilon_2$

Cada dominio tiene una extensión de unos 110 restos aminoacídicos y presenta un puente disulfuro intracatenario entre cisteínas separadas por unos 60 residuos. Existen dos de estas zonas o dominios en cada una de las cadenas livianas y cuatro en las pesadas (figs. 30-2 y 30-3).

Zonas variables. El dominio inicial V de cada cadena abarca la mitad de la longitud total de la cadena liviana y un cuarto de la pesada. Este trozo presenta diferencias en la secuencia de aminoácidos entre distintos anticuerpos y por ello recibe el nombre de zona variable. Se la distingue con la notación V_L para la región variable de cadena liviana y V_H para la de cadena pesada. Dentro de estas zonas variables existen al menos tres segmentos en los cuales las diferencias de secuencia entre anticuerpos distintos son aún más marcadas que en el resto del dominio. A estos trozos se los denomina segmentos *hipervariables*. Las secuencias hipervariables representan aproximadamente el 25% de la longitud total de los dominios V_L y V_H.

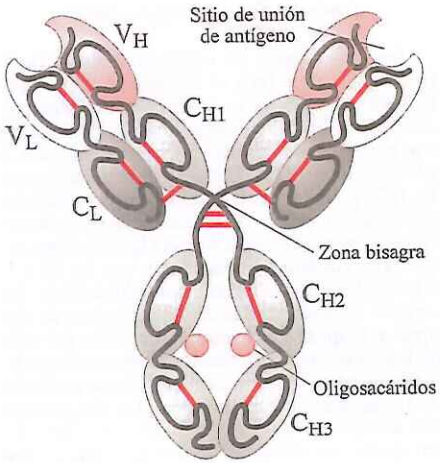


Fig. 30-3. Esquema de una unidad estructural de IgG. Se han representado los dominios que componen las subunidades pesadas (H) y livianas (L); en rosado, dominios variables de cadenas pesadas (V_H), en gris claro, dominios constantes (C_H). En blanco, dominios variables de cadenas livianas (V_L): en gris oscuro, los constantes (C_L). Los trazos en rojo indican puentes disulfuro intra- e intercatenarios. Las esferas rosadas indican carbohidratos.

Sitio de unión del antígeno. La zona variable de una cadena pesada se enfrenta con la de una cadena liviana y forman entre ambas un nicho en el cual puede alojarse el antígeno. En esta región, llamada *paratopo* (o *paratope*), reside la especificidad de la Ig. La conformación que adopta la molécula a este nivel permite al anticuerpo reconocer un antígeno determinado. Cuando entre el sitio de unión de la Ig y el epitopo existe complementariedad estructural se produce un encaje recíproco anticuerpo-antígeno y se establecen uniones no covalentes (puentes de hidrógeno, atracciones hidrofóbicas y electrostáticas y fuerzas de van der Waals) entre grupos funcionales de epitopo y paratopo.

Como las mayores diferencias en la secuencia de aminoácidos se encuentran en los segmentos hipervariables, son ellos los principales responsables de la especificidad de los anticuerpos. A esos segmentos se los llama también *regiones determinantes de complementariedad* (CDR en las siglas inglesas).

Una molécula de inmunoglobulina G tiene dos sitios de unión y puede fijar dos antígenos. Los dos sitios de fijación del antígeno de una unidad estructural de Ig tienen idéntica configuración, es decir, igual especificidad.

Un anticuerpo se une al antígeno con mayor o menor afinidad según sea el grado de complementariedad e interacciones recíprocas entre paratopo y epitopo. Cuando el antígeno posee varios epitopos idénticos, puede suceder que un anticuerpo se fije a dos de ellos.

La fuerza con la cual el anticuerpo se une a un antígeno se denomina *avidez*. La avidez es dependiente de la afinidad entre antígeno y anticuerpo.

Con antígenos que posean dos o más epitopos iguales suelen producirse, al fijarse los anticuerpos, precipitados formados por una malla en la cual las Ig hacen de puente entre dos antígenos.

En el caso de antígenos del tipo de toxinas bacterianas o de algunos virus, la unión con el

anticuerpo es suficiente para neutralizarlos y prevenir su acción nociva sobre las células, pero, en general, la eliminación de muchos inmunógenos requiere la interacción con otras células o moléculas (véase más adelante).

Zonas constantes. El resto de las cadenas H y L, desde el fin de la zona variable hasta el extremo C-terminal, tiene la misma estructura primaria para todas las subunidades de igual clase y es llamada *zona constante*. Cada cadena liviana posee un dominio constante, designado C_L; las cadenas pesadas tienen tres dominios constantes (C_{H1} a C_{H3}). Entre los dominios C_{H1} y C_{H2} se extiende un segmento de 10 a 15 aminoácidos, correspondiente a la denominada región *bisagra* (fig. 30-2). En esta zona se encuentran varios restos cisteína y prolina. Los primeros pueden establecer enlaces disulfuro entre las dos cadenas pesadas de una unidad estructural, mientras la presencia de prolinas otorga flexibilidad a este trozo de la molécula y permite modificar el ángulo que forman las dos ramas de la Y, lo cual facilita la aproximación y unión al antígeno. Los carbohidratos de estas glicoproteínas se fijan al dominio C_{H2}. Su unión es de tipo N-glicosídico (pág. 90) entre el N de un resto asparragina y N-acetilglucosamina.

Fragmentos Fab y Fc. Si se tratan las unidades estructurales con papaína, enzima proteolítica de origen vegetal, se produce ruptura a nivel de la zona bisagra de ambas cadenas pesadas y se originan tres segmentos: dos de ellos, iguales entre sí, están constituidos por una cadena liviana completa unida por enlaces disulfuro a un trozo de cadena pesada que comprende los dominios V_H y C_{H1}. Se los denomina *segmentos Fab*; cada uno contiene uno de los sitios de unión al antígeno. El tercer fragmento está formado por las porciones restantes de ambas cadenas pesadas, desde el comienzo de la región bisagra hasta el extremo C-terminal, unidas por puentes S–S. Este tercer segmento recibe el nombre de Fc (fig. 30-2).

El segmento Fc es responsable de interacciones no específicas del complejo antígeno-anticuerpo con otras moléculas y con receptores en superficies celulares. Algunos ejemplos ilustran acerca de su papel: a) La unión de anticuerpos a epitopos de bacterias no es suficiente para detener su multiplicación libre. El papel de los anticuerpos en estos casos es promover la captación de las bacterias por células fagocíticas que han de destruirlos. Los fagocitos reconocen las regiones constantes (Fc) de las Ig unidas a la superficie de la bacteria. El revestimiento de los organismos patógenos o partículas extrañas por anticuerpos es llamado *opsonización*. b) La activación del sistema del complemento (véase más adelante) se inicia cuando uno de sus componentes se une a la porción Fc de complejos antígeno-anticuerpo. Esta activación desencadena las acciones de lisis o fagocitosis del agente invasor. c) La protección inmunitaria del recién nacido depende de las IgG transferidas desde la sangre materna durante la vida fetal. El segmento Fc de esas Ig está comprometido en el transporte a través de la placenta. d) Las IgE están relacionadas con la defensa contra parásitos y también con los fenómenos alérgicos. La porción Fc de esas inmunoglobulinas se une a receptores específicos de eosinófilos, plaquetas y neutrófilos para mediar acciones tóxicas contra parásitos. También pueden fijarse a basófilos, células cebadas (mastocitos) y macrófagos y desencadenar fenómenos de hipersensibilidad, con liberación de leucotrienos, prostaglandinas, enzimas lisosomales e histamina, sustancias responsables de reacciones alérgicas y anafilácticas. e) Las IgA secretadas por células plasmáticas en las submucosas son transportadas a través de los epitelios. Para ello se unen por su porción Fc a un receptor en las células epiteliales. Las complejas interacciones de las inmunoglobulinas con diversas células son mediadas por esos receptores de superficies celulares.

Isotipos de cadenas pesadas

Los cinco tipos de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE) se distinguen entre sí por la clase o *isotipo* de su cadena pesada. Hay cinco isotipos de subunidades pesadas, designadas con letras griegas: μ (mu), γ (gamma), α (alfa), δ (delta) y ε (épsilon). Las IgM tienen cadenas μ; las IgG, γ, de las cuales existen cuatro subclases distintas (γ_1 a γ_4; la γ_3 tiene una región bisagra mucho más extensa que las de otras IgG); las IgA, α, que presenta dos subclases (α_1 y α_2); las IgD, δ, y las IgE, ε. En todas las inmunoglobulinas, las cadenas livianas pueden ser de cualquiera de dos tipos: κ (kappa) o λ (lambda). Alrededor del 65% de los anticuerpos circulantes poseen cadenas livianas kappa y el resto, lambda. En una molécula de Ig las dos cadenas livianas y las dos pesadas son siempre de la misma clase, es decir, no existen Ig con una subunidad liviana κ y otra λ, o con una cadena pesada μ y otra γ, por ejemplo.

Las cadenas pesadas γ (de IgG), α (de IgA) y δ (de IgD) presentan tres dominios constantes (C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}) además del variable (V_H); las de IgM e IgE, μ y ε respectivamente, poseen cuatro dominios constantes (C_{H1} a C_{H4}) y no tienen región bisagra. Las cadenas α y μ tienen un trozo C-terminal

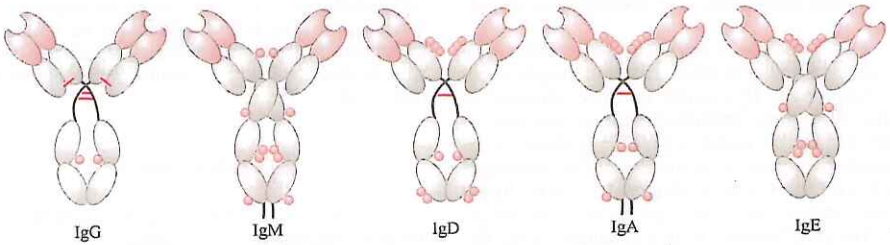


Fig. 30-4. Estructura básica de los distintos tipos de Ig. Los trazos en rojo indican puentes disulfuro intercatenarios. En rosado, dominios variables; en gris, dominios constantes. Las esferas rosadas representan oligosacáridos.

de 18 aminoácidos a continuación del dominio final (C_{H3} y C_{H4} respectivamente). La cantidad de cadenas oligosacarídicas y los sitios de inserción varían entre las distintas Ig (fig. 30-4).

Las inmunoglobulinas G, D y E están constituidas por una sola unidad estructural como la descrita. Todas ellas disponen de dos sitios de unión para antígeno. Las IgM son comúnmente pentámeros; el conjunto presenta un total de 10 cadenas H, 10 cadenas L y 10 sitios de fijación de antígeno. Las unidades de los pentámeros están unidas por puentes disulfuro entre dos dominios C_{H3} adyacentes y entre los trozos C terminales de 18 aminoácidos. Una cadena adicional de 15 kDa, designada J (de *join*, unir), se une por puentes disulfuro a dos de esos segmentos, enlaza las subunidades y promueve su polimerización (fig. 30-5). Los extremos C-terminales de todas las cadenas pesadas del pentámero se dirigen hacia el centro del complejo y los sitios de unión del antígeno irradian hacia la periferia de la molécula (fig. 30-5).

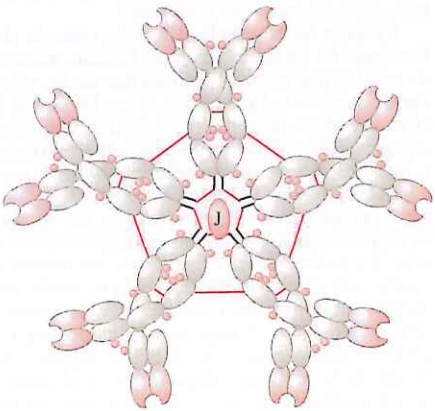


Fig. 30-5. Pentámero de IgM. Los trazos rojos indican puentes disulfuro. J: cadena de unión.

Las IgA se encuentran en el plasma como monómeros, pero en las secreciones (saliva, lágrimas, leche) y en las mucosas de los tractos respiratorio, genitourinario y gastrointestinal, donde son relativamente abundantes, se presentan como dímeros (la subclase IgA_1 predomina en suero y en secreciones nasales, lágrimas y leche; en el colon es más abundante la IgA_2). Las unidades están asociadas por medio de una cadena de enlace J; una pieza o *componente secretorio* de 70 kDa se une al complejo cuando es secretado a través de las células epiteliales. Este componente facilita el transporte de IgA y lo protege de ataques por proteasas (fig. 30-6).

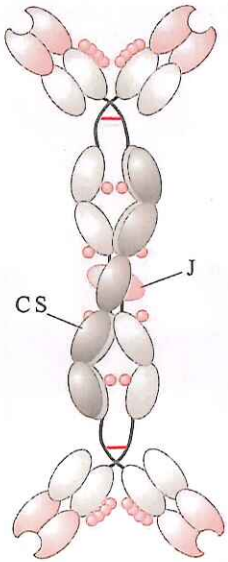


Fig. 30-6. Dímero de IgA. Los trazos en rojo indican puentes disulfuro; J: cadena de unión; CS; componente secretorio (en gris oscuro).

Inmunoglobulinas de membrana (Ig_m)

Los linfocitos B presentan IgM e IgD unidas a su membrana externa. Las inmunoglobulinas de membrana (Ig_m) tienen un trozo adicional de unos 29 o más aminoácidos en el extremo C-terminal de las cadenas pesadas, ausente en las correspondientes Ig plasmáticas. Este segmento está formado por aminoácidos de carácter hidrófobo; atraviesa la bicapa lipídica de la membrana y sirve para "anclar" la Ig a la superficie del linfocito B; los últimos residuos, de carácter hidrófilo, sobresalen hacia el lado citoplasmático de la membrana. Las IgM de membrana son monómeros; las unidades estructurales no pueden formar pentámeros como los existentes en el plasma.

Los sitios de unión de antígeno de estas Ig se proyectan hacia fuera de la célula y actúan como verdaderos receptores. Las Ig expuestas en la superficie de cada linfocito tienen todas igual especificidad, reconocen todas el mismo epitopo. Por otra parte, existe una enorme variedad entre los linfocitos B de un individuo en cuanto a la especificidad de antígeno de las Ig en su membrana. Esta diversidad permite al organismo disponer de receptores para cualquier molécula antigénica que pueda invadirlo. Más adelante se analizará el origen de esta variabilidad.

Las IgM e IgD insertas en la membrana de los linfocitos B se asocian a dos heterodímeros $\alpha\beta$ para formar el complejo receptor (fig. 30-7). Las subunidades α y β de estos complejos tienen cada una un segmento transmembrana y un dominio citoplasmático que puede ser fosforilado por tirosina quinasa e iniciar la transmisión de señales al interior de la célula.

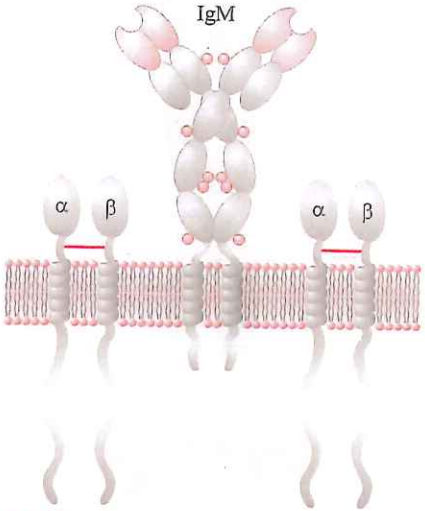


Fig. 30-7. Complejo receptor de linfocitos B. IgM de membrana.

Selección clonal

La respuesta inmune comienza cuando un antígeno ingresado en el organismo es captado por los sitios de unión de las Ig de superficie de un linfocito B. Por supuesto, sólo participan los receptores cuyos paratopos presenten la debida complementariedad estructural con los epitopos del invasor. Se inicia entonces la activación de los linfocitos B a los cuales se ha fijado el antígeno. En este proceso desempeña un papel muy importante uno de los tipos de células T (pág. 679).

El linfocito B activado por su asociación al antígeno y otros estímulos (ver más adelante) se multiplica y diferencia en *células plasmáticas* que sintetizan y secretan anticuerpos con la misma especificidad que la Ig de membrana del linfocito B del cual derivan (la notación Ig_s se utiliza para indicar a estos anticuerpos secretados). Se ha producido una *selección clonal* (todas las células plasmáticas formadas a partir de una única célula B original constituyen un clon).

Como un agente invasor puede presentar múltiples determinantes antigénicos, suelen generarse tantos clones, y por ende tantos anticuerpos diferentes, como epitopos distintos hayan sido reconocidos por sendos linfocitos B. Se habla en esos casos de *respuesta policlonal*.

Células de memoria. En el proceso de diferenciación del linfocito B se forman, además de células plasmáticas productoras de Ig, *células de memoria*. Así se llama a los linfocitos B cuya superficie presenta Ig receptoras con igual especificidad que las de la célula B primigenia y que tienen una vida media mucho más prolongada que ella. Mientras el linfocito B "virgen" original dura varias semanas, las células de memoria permanecen en circulación meses o años. La formación de estas células de memoria explica por qué, ante una segunda invasión del antígeno, el organismo reacciona más rápida e intensamente. En el segundo encuentro hay un número mucho mayor de células B capaces de reconocer y unirse al antígeno que en el primero. La subsiguiente activación y multiplicación de estas células aumenta exponencialmente la respuesta.

Naturaleza del antígeno

Los antígenos (Ag) o inmunógenos que provocan la respuesta inmune humoral suelen ser moléculas de gran tamaño, por lo común proteínas o heteropolisacáridos. El determinante antigénico o epitopo constituye sólo una porción de esas macromoléculas y debe estar expuesto en su superficie, pues de lo contrario no podría interactuar directamente con el sitio de fijación de la Ig.

Los lípidos y ácidos nucleicos son poco eficaces como antígenos, pero acentúan su capacidad inmunogénica si se unen a proteínas. Algunas moléculas pequeñas, que aisladas no son inmunógenos, se convierten en tales cuando se fijan a macromoléculas adecuadas. Esas moléculas pequeñas reciben el nombre de *haptenos*.

El encaje entre anticuerpo y antígeno no es rígido (como el modelo de "la llave y la cerradura"), sino una adaptación mutua, semejante a la del sitio activo de una enzima y su sustrato. Determinantes antigénicos con mayor plasticidad tienen mejores posibilidades de acomodarse en el sitio de unión, también plástico, de la Ig. Por esta razón, porciones plegadas de la molécula de inmunógeno con cierto grado de flexibilidad constituyen buenos determinantes antigénicos. En el caso de antígenos proteínicos, comúnmente están comprometidos en la conformación del epitopo alrededor de 15 aminoácidos, no necesariamente contiguos en la cadena polipeptídica. Su agrupamiento en una región determinada de la molécula es el resultado de los plegamientos y la disposición tridimensional de la cadena. Si se desorganizan las estructuras secundaria y terciaria del antígeno mediante agentes desnaturalizantes, es posible que deje de ser reconocido por el anticuerpo específico.

Si bien la característica más llamativa de los anticuerpos es su especificidad, a veces una Ig puede fijarse a diversos antígenos. Esto se denomina *reactividad cruzada* y ocurre cuando diferentes inmunógenos presentan epitopos comunes, como sucede en proteínas homólogas de distintas especies.

DIVERSIDAD GENÉTICA DE INMUNOGLOBULINAS

Variabilidad de anticuerpos

Se estima que el organismo es capaz de producir más de 10^7 inmunoglobulinas diferentes entre sí en cuanto a su especificidad de antígeno. Por esta razón, aun cuando sea muy grande la variedad de antígenos con los cuales puede verse enfrentado un individuo a lo largo de su vida, siempre dispondrá de algún anticuerpo cuyos sitios de unión tengan la conformación adecuada para fijarse a alguno de los epitopos.

La variabilidad de las Ig radica fundamentalmente en las diferencias de secuencia de aminoácidos en los sectores hipervariables de los dominios V_H y V_L. El resto de las cadenas mantiene una estructura notablemente constante.

El fenómeno de la diversidad de anticuerpos resultaba difícil de interpretar desde el punto de vista genético. Sin embargo, los avances de la biología molecular han permitido explicar cómo un grupo relativamente pequeño de genes controla la síntesis de un número elevadísimo de proteínas diferentes.

Los genes de Ig están agrupados en tres *loci* en distintos cromosomas. Durante la maduración de linfocitos B se produce reorganización del ADN. En cada locus se ensamblan unos pocos segmentos de ADN, elegidos al azar, para formar el bloque codificante que será transcripto. De esta manera, cada linfocito B adquiere información genética para sintetizar Ig con especificidad única, distinta de la de anticuerpos generados por otras células.

Disposición de los genes de cadenas pesadas

En las células germinales, la región variable de cadenas pesadas (V_H) es codificada por tres conjuntos de genes. El primer grupo (en sentido 5'→3' de la hebra de ADN) se denomina V (de variable), el segundo, D (de diversidad), y el tercero, J (del inglés *joining*, unión). Los distintos grupos, así como los genes que comprenden, están separados por secuencias intermedias de ADN no codificante (fig. 30-8 A).

El conjunto V contiene 51 genes funcionales, cada uno de los cuales comprende dos exones. Codifican un péptido líder o señal, necesario para el pasaje de la cadena a través de la membrana del retículo endoplásmico, y los primeros 98 aminoácidos del extremo N-terminal de V. El D es un grupo de 25 genes diferentes que codifican los aminoácidos 99 a 105. El conjunto J abarca 6 genes con información para el ordenamiento de los últimos aminoácidos del dominio V_H.

A continuación, cerca del conjunto J, se disponen los genes de la región constante (C_H). A diferencia de los de región variable, que poseen múltiples genes para un mismo trozo de cadena, los de C_H sólo poseen un gen para cada una de

las clases y subclases de cadenas H (isotipos). Se ubican en este orden (en el sentido 5'→3'): μ, δ, γ_3, γ_1, α_1, γ_2, γ_4, ε y α_2. Estos genes están compuestos por varios exones para los dominios constantes (3 o 4 según la clase) y los correspondientes intrones. En algunos isotipos, entre los exones de los dominios C_{H1} y C_{H2} hay otro más pequeño que codifica la región bisagra. Al final de los exones de dominios constantes se encuentran los de la porción terminal intramembrana de las Ig_m (fig. 30-11).

Disposición de los genes de cadenas livianas

Cadenas kappa. La región variable de cadenas livianas es codificada por dos grupos de genes (V y J). Falta el conjunto D de las cadenas pesadas. El sector V comprende alrededor de 40 genes funcionales, cada uno de los cuales codifica el péptido líder y los aminoácidos 1 a 95 del dominio variable. El conjunto J posee 5 genes que codifican las posiciones 96 a 108. Más adelante se encuentra un gen para el dominio constante (fig. 30-8 B).

Cadenas lambda. Existen dos conjuntos para la región variable. Se estima en 31 el número de genes grupo V y en 4 el del J. En contraste con los *loci* de cadenas H y L κ, con un gen para región constante, el de cadena L λ tiene al menos 6 para el dominio C. La disposición de los genes está representada en la figura 30-8 C.

Reorganización de genes de Ig

En el curso de la maduración de linfocitos B en la médula ósea tiene lugar una recombinación y eliminación de genes de dominios variables. El proceso comienza con el reordenamiento de genes de la zona variable de cadenas H. Uno cualquiera de los genes del conjunto D se aproxima y se une a uno de los genes del grupo J para formar un trozo continuo DJ. Posteriormente, un gen V, tomado al azar, se acerca al trozo DJ y se acopla a éste en un bloque continuo VDJ. Las porciones de ADN comprendidas entre los segmentos VD y DJ seleccionados, con todos los genes que contienen, son escindidas y eliminadas. La *configuración reordenada* resultante codifica el dominio variable de la cadena (fig. 30-9).

En los *loci* de cadenas livianas, el reordenamiento comprende la aproximación y unión de un gen V con uno J para formar el bloque VJ a transcribir (fig. 30-10).

Un sistema enzimático cataliza el empalme de los segmentos D-J, V-DJ o V-J y la eliminación del material comprendido entre los trozos selec-

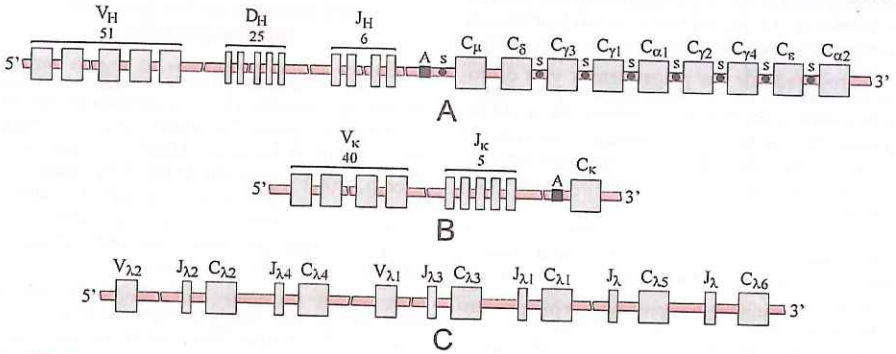


Fig. 30-8. Esquema de la disposición de genes de inmunoglobulinas en células germinales humanas. **A.** Genes de cadenas pesadas (localizados en cromosoma 14). Los genes de dominio variable están separados en tres grupos: V_H comprende 51 genes funcionales; D_H, 25 genes y J_H, 6 genes. Cada gen del grupo V está formado por dos exones (no representados en la figura) el primero de los cuales codifica para la secuencia líder o señal. La zona constante tiene sólo un gen para cada isotipo. Cada gen C está formado por varios exones y sus correspondientes intrones (no representados). Hay exones para cada uno de los dominios C_H, para la región bisagra y para la porción intramembrana de las Ig_m. El cuadrado negro antes de los genes C (A) representa la secuencia potenciadora o *enhancer*, los círculos negros (s) delante de cada gen de cadena H (excepto el de δ) indican la secuencia que controla el cambio (*switch*) de isotipo. **B.** Genes de cadenas livianas κ (localizados en el cromosoma 2). Los genes de dominio variable están separados en dos grupos: C_κ 40 genes, y J_κ, 5 genes. Hay sólo un gen de zona constante, precedido por la secuencia aumentadora (A). **C.** Genes de cadenas livianas λ (localizados en el cromosoma 22). Hay dos grupos de genes de dominio variable (31 V_λ y 4 J_λ) y 6 genes de dominio constante (C_λ) intercalados con los genes J.

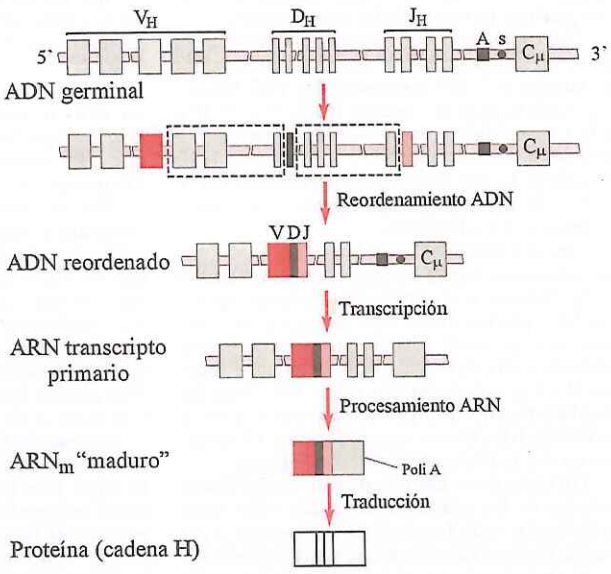
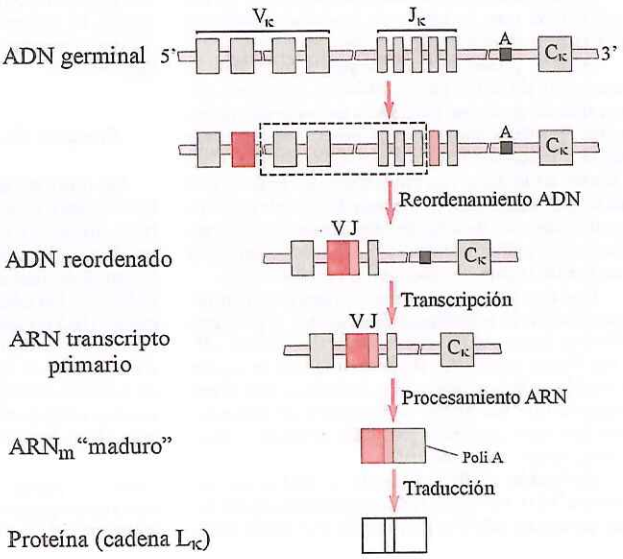


Fig. 30-9. Esquema del reordenamiento de genes de la región variable de cadena H humana en linfocitos B. No se han representado todos los genes de la región constante; sólo se indica el C_μ. Los genes de cadena variable elegidos se indican en rojo para el V, en negro para el D y en rosado para el J. Las porciones intermedias de ADN (encerradas en rectángulos en línea cortada) son eliminados. En el ADN reordenado se forma un bloque VDJ que codifica para la región variable y desaparecen las porciones intermedias de ADN. Durante el procesamiento del ARN (*splicing*) se eliminan del transcripto primario las porciones correspondientes a los genes V y J restantes y se agrega el de región constante para completar el ARN "maduro" de la cadena H completa. En el extremo 3' se añade la "cola" de poli-A. El cuadrado A y el círculo s negros indican *enhancer* y control de *switch* respectivamente.

cionados. Las secuencias no codificantes inmediatas a los extremos 3' de genes V y D y a los 5' de genes D y J poseen características definidas. Los segmentos de esas secuencias flanqueantes son complementarios y permiten que el trozo de hebra comprendido entre los dos genes que se aproximan forme un asa, que luego es escindida y eliminada del genoma del linfocito B. Este proceso de reordenamiento de ADN se cumple en células de la línea germinal de linfocitos. No hay



Fg. 30-10. Esquema del reordenamiento de genes de la región variable de la cadena L κ en linfocitos B. Los genes elegidos se indican en rojo para el V y en rosado para el J. La porción intermedia de ADN que se indica encerrada en el rectángulo en línea cortada es eliminada. El ADN reordenado forma un bloque VJ que codifica para la región variable. Durante el procesamiento del ARN (*splicing*) se eliminan las porciones correspondientes a los genes V y J no utilizados y se agrega el transcripto del gen de la región constante. En el extremo 3' se añade la "cola" de poli-A. El cuadrado negro (A) indica la posición del *enhancer*.

ejemplos de ese tipo de recombinación de material genético en otras células de eucariotas.

Una estimación aproximada de la variabilidad que estas reorganizaciones pueden generar indica un número de 7.650 combinaciones VDJ diferentes posibles para las cadenas H (51 V × 25 D × 6 J). La cantidad de ensambles VJ de cadena L κ diferentes sería de 200 (40 V × 5 J). En el *locus* de cadena λ, 124 combinaciones posibles (31 V × 4 J). Es decir, se pueden formar 324 cadenas livianas (κ + λ) diferentes.

Una vez formadas las cadenas H y L, no existen restricciones para su asociación en moléculas de Ig. Cadenas H resultantes de cualquier ensamble VDJ pueden unirse con cadenas L de cualquier configuración. Las posibilidades de formar sitios de unión de antígeno diferentes entre cadenas H y L (κ y λ) es cercana a $2{,}5 \cdot 10^6$. Como los reordenamientos de ADN se efectúan al azar, la posibilidad de obtener ensambles VDJ-VJ idénticos en dos linfocitos diferentes es bajísima.

Otros factores incrementan la variabilidad. Además de los reordenamientos del ADN, otros mecanismos contribuyen significativamente a aumentar la diversificación de las inmunoglobulinas.

a) *Imprecisión en el empalme* de los genes cuando se forman los bloques VDJ y VJ. No siempre el corte de los segmentos elegidos se hace exactamente al final o al comienzo de un codón sino una, dos o hasta tres bases más abajo (hacia el extremo 3'). Al realizarse la unión de los trozos cambia el marco de lectura.

b) *Adición de nucleótidos al extremo 3'* de los segmentos que se unen, en reacción catalizada por la *desoxinucleotidil transferasa terminal*.

Ambos procesos contribuyen a modificar la secuencia de bases en los sitios de empalme, generando codones no existentes en los genes originales. También suele ocurrir, como consecuencia de la adición de nucleótidos, desfasamiento del "marco de lectura", en cuyo caso los cambios son de mayor magnitud. Si a causa del desplazamiento del marco de lectura uno de los nuevos codones formados indica terminación, el reordenamiento no resulta viable; es *abortivo* o no productivo.

Los dos mecanismos mencionados tienen lugar durante el reordenamiento de los segmentos génicos de las células precursoras de linfocitos B. Otro factor generador de diversidad en la región variable es la *hipermutación somática*, que opera después que los genes codificantes de anticuerpos han sido ensamblados. Más adelante volveremos sobre este tema.

Exclusión alélica. Cuando se forma un ensamble VDJ satisfactorio o productivo, tiene lugar un efecto inhibitorio, llamado *exclusión alélica*, que impide la recombinación en el otro alelo[1] de la misma célula. La exclusión alélica asegura la síntesis de Ig monoespecíficas en cada linfocito B.

Sólo en caso de reordenamiento abortivo en un alelo, el ensamble prosigue en el otro. Si en este segundo intento tampoco se obtiene un bloque VDJ funcionante, la célula no continúa su diferenciación.

Una vez obtenido un trozo VDJ productivo, comienza el ensamble de los genes de región variable de cadena liviana κ. Si se obtiene un bloque VJ viable se produce exclusión alélica y no hay reorganización en el otro alelo para dominio V κ. También se inhibe el reordenamiento del *locus* de cadena λ, razón por la cual nunca se producen subunidades κ y λ en una misma célula. Sólo cuando fracasa el ensamble en ambos alelos κ se inicia el de VJ para la cadena λ.

Síntesis de Ig de membrana. El linfocito B maduro sintetiza inmunoglobulinas de membrana (Ig_m), principalmente IgM e IgD, que actúan como receptores en su superficie. Para esta síntesis, en el *locus* de cadenas H se transcribe el bloque VDJ reordenado y los genes, μ y δ de la región constante, incluidos dos exones para el segmento terminal transmembrana. Durante el procesamiento del ARN (*splicing*) tiene lugar la selección de los exones de dominios constantes, μ o δ. La adición del trozo transmembrana es controlada por la señal de poliadenilación en el flanco 3' de los exones correspondientes. Si bien las Ig producidas poseen cadenas pesadas diferentes, su especificidad de antígeno es idéntica, ya que siempre se utiliza el mismo trozo VDJ (fig. 30-11).

Síntesis de Ig de diferentes isotipos

Un linfocito activado por la unión a un antígeno da origen a un gran número de células plasmáticas, todas las cuales sintetizan anticuerpos de igual especificidad que la del linfocito original. Se produce una *selección clonal*. Las Ig sintetizadas por las células plasmáticas y secretadas al medio (Ig_s) no poseen el trozo intramembrana en el extremo C-terminal de las cadenas H. La síntesis selectiva de Ig_m o Ig_s es regulada por señales de poliadenilación ubicadas a ambos lados de los exones correspondientes al segmento intramembrana (fig. 30-11).

[1] Toda célula diploide posee un juego de cromosomas de origen materno y otro paterno. Los genes de cada uno de esos juegos que ocupan el mismo *locus* en cromosomas homólogos se llaman *alelos*.

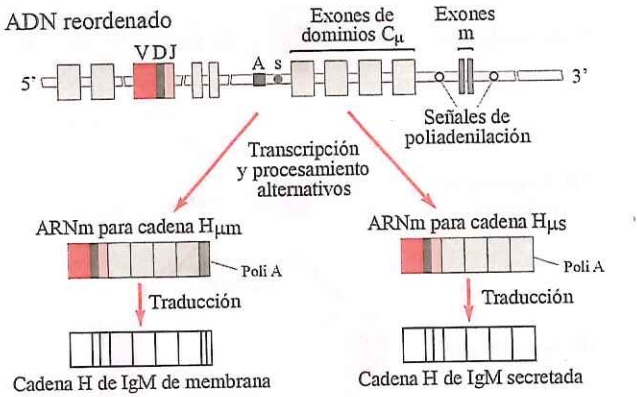


Fig. 30-11. Esquema de la transcripción y procesamiento alternativos de IgM_m (de membrana e IgM_s (secretada). Se representan sólo los exones de isotipo μ y los genes de la región variable ya reordenados. Después de los exones de dominios constantes C_{H1} a C_{H4} se encuentran dos pequeños exones de la porción transmembrana (en gris oscuro) flanqueados por señales de poliadenilación. De éstas depende la transcripción de Ig_m o Ig_s. Como el bloque VDJ no cambia, ambas Ig tienen idéntica especificidad de antígeno.

Iniciada la activación del linfocito B, dejan de producirse IgD. Las células plasmáticas engendran primero IgM y, al cabo de unos días, IgG y otras clases de Ig. Para que ocurra el cambio (*switch*) de isotipo de cadenas pesadas, debe operarse un nuevo reordenamiento en el ADN (fig. 30-12). El bloque VDJ es aproximado a un gen distinto de μ; el segmento intermedio que va desde VDJ hasta el nuevo gen C es eliminado. Algunos trozos de ADN de secuencia conservada, localizados en el segmento no codificante previo a cada gen C (indicados con *s* en la fig. 30-12), desempeñan un papel importante en el cambio de isotipo. El gen δ es el único que no posee esa secuencia.

A pesar del cambio de isotipo, la especificidad de la Ig sintetizada por la misma célula no se modifica, pues siempre se utiliza el mismo trozo VDJ.

Secuencias reguladoras en genes de Ig

La síntesis de Ig sólo tiene lugar en linfocitos B maduros y en células plasmáticas derivadas de ellos, con sus genes en la configuración reordenada. La regulación de la actividad de estos genes depende principalmente de secuencias localizadas entre el último gen J y el primero constante. Estas secuencias reciben el nombre de potenciadoras (en inglés *enhancer*) y son responsables de activar la transcripción del promotor de genes de Ig. Cuando se produce el cambio (*switch*) de isotipo, el potenciador o *enhancer* se desplaza junto con el bloque VDJ hacia su nueva posición, inmediata a otro gen constante (fig. 30-12).

La intensa actividad de síntesis de Ig en las células plasmáticas es promovida por estos sitios regulatorios y explica la transformación neoplásica cuando un oncogén es insertado en una posición próxima a un enhancer de Ig (ej.: linfoma de Burkitt).

Células de memoria

Una fracción de los linfocitos originados por multiplicación de la célula B inicial se desempeña como *células B de memoria*, que permanecen largo tiempo en circulación (meses a años), todas con receptores de especificidad idéntica a la de la célula original. En los bloques VDJ y VJ de los genes reordenados de estas células la incidencia de mutaciones puntuales es muy alta (10^{-3} por nucleótido, por generación celular). Este fenómeno, llamado *hipermutación somática*, produce cambios de aminoácidos en las zonas variables de Ig. Cuando la mutación resulta en una modificación estructural que mejora la adaptación del sitio de unión con el epitopo, la afinidad antígeno-anticuerpo aumenta. En consecuencia, en nuevos encuentros con el antígeno, éstos reaccionarán preferentemente con células portadoras de una mutación favorable, las que serán selectivamente activadas para producir células plasmáticas y nuevas células de memoria. Este fenómeno explica por qué las respuestas inmunes a reiterados ingresos de un antígeno son más intensas y eficientes que la primaria. Siempre una nueva llegada del antígeno encuentra células de memoria, lo cual implica un número mucho mayor de linfocitos B que pueden reconocerlo. La producción de células plasmáticas, y por ende de anticuerpos, aumenta notablemente. Pero además, el antígeno selecciona aquellas células mutadas con mayor afinidad y promueve la expansión clonal de las más aptas.

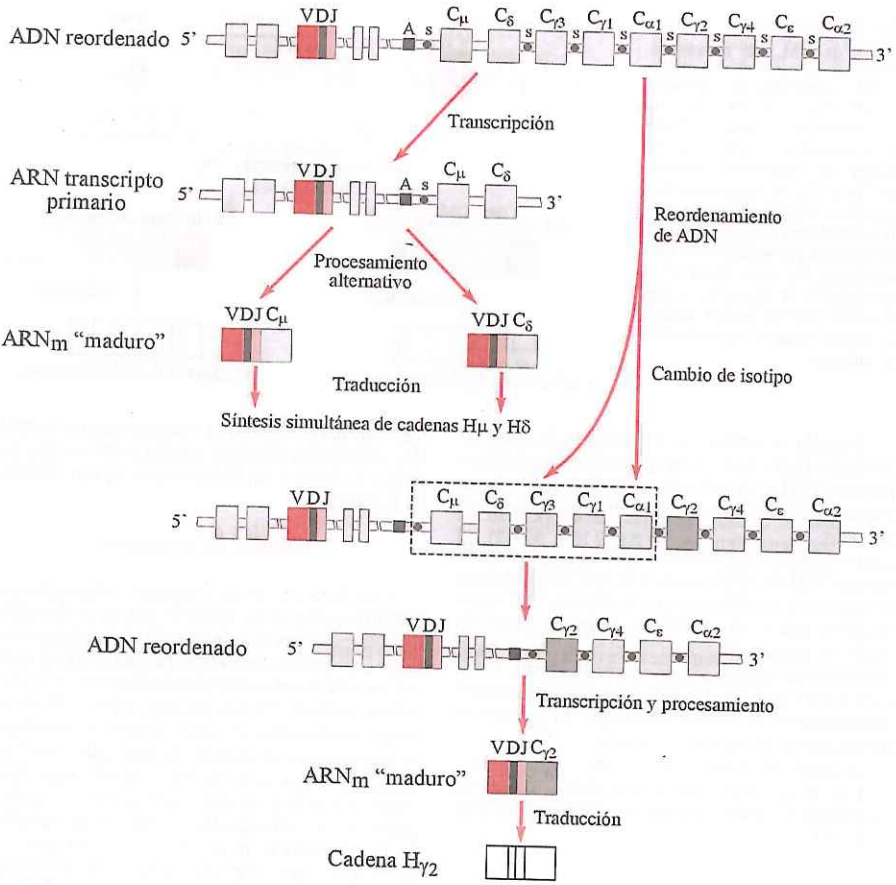


Fig. 30-12. Esquema del cambio de isotipo de cadenas pesadas de Ig. En el linfocito B con ADN reordenado para la región variable se transcriben y procesan alternativamente cadenas μ y δ. Para producir Ig de otro isotipo se requiere un nuevo reordenamiento del ADN (en la figura se representa, como ejemplo, el cambio a γ_2). Los genes C anteriores al elegido son eliminados (indicados dentro del rectángulo en línea cortada). Los pequeños círculos negros (*s*) antes de cada gen C señalan las secuencias de cambio (*switch*). Cualquiera sea el isotipo elegido siempre se utiliza el mismo bloque VDJ, razón por la cual todas las cadenas H sintetizadas tienen la misma especificidad.

Anticuerpos monoclonales

Son los sintetizados por células plasmáticas de un mismo clon, es decir, descendientes del mismo linfocito original. Esos anticuerpos tienen idéntica especificidad de antígeno; todos reconocen el mismo epitopo.

Köhler y Milstein idearon procedimientos para obtener anticuerpos monoclonales contra un determinado antígeno. Un paso fundamental del método de obtención de estas inmunoglobulinas es la hibridación de linfocitos aislados del bazo de un ratón inmunizado con células de un tumor maligno llamado mieloma, portadoras de defectos que las hacen incapaces de multiplicarse en un medio de cultivo de composición especial. Los linfocitos producen anticuerpos específicos contra el antígeno utilizado en la inmunización.

Las células del bazo, mezcladas *in vitro* con las de mieloma en presencia de un agente fusionante

como el propilenglicol, forman células híbridas. Estas heredan propiedades de ambas progenitoras: se mantienen indefinidamente en cultivo como las del mieloma y secretan al medio anticuerpos idénticos a los de las células plasmáticas originales. Sólo se desarrollan las células híbridas, ya que los linfocitos no pueden permanecer mucho tiempo en cultivo y las de mieloma son incompetentes para subsistir en el medio especial utilizado. Las células fusionadas, en las que los linfocitos aportan las enzimas que faltan a las mielomatosas, pueden continuar reproduciéndose.

Mediante diversos recursos se seleccionan las células híbridas con capacidad para elaborar el anticuerpo que se desea aislar. Estas células, inoculadas a un ratón, producen tumores llamados *hibridomas*.

Uno de los procedimientos más utilizados para la obtención de inmunoglobulinas monoclonales utiliza cultivos de células híbridas. Los anticuerpos elaborados son secretados al medio y alcanzan en éste altas concentraciones. El sobrenadante del cultivo es el material del cual se aíslan y purifican las Ig. También se pueden producir anticuerpos monoclonales *in vivo* si se inoculan ratones con células híbridas para producir hibridomas. Las Ig se separan del plasma sanguíneo de los animales portadores de tumores secretantes de anticuerpos. Con estos métodos se obtienen en cantidad inmunoglobulinas "hechas a medida" de cualquier antígeno.

Los anticuerpos monoclonales han encontrado numerosísimas aplicaciones en diversos campos de la investigación biológica y médica.

A título de ejemplo se citarán sólo algunos de sus usos en medicina. Se los utiliza para identificar o localizar antígenos tumorales y posibilitar el diagnóstico precoz de neoplasias o metástasis, para reconocer microorganismos patógenos o antígenos de histocompatibilidad.

También han sido empleados como agentes terapéuticos, en especial en el tratamiento de tumores malignos y de artritis reumatoidea.

COMPLEMENTO

El sistema del complemento está constituido por un conjunto de proteínas del plasma sanguíneo que participan en acciones de defensa; promueven la lisis o fagocitosis de células extrañas, bacterias y virus. Algunas de esas proteínas son zimógenos o proenzimas; su activación por reacciones en cascada pone en funcionamiento el sistema.

Se conocen dos sistemas interrelacionados:

a) *Vía clásica*. Funciona en el sistema adaptativo; es activada por la formación de agregados de complejos antígeno-anticuerpo. Favorece la eliminación de células y microorganismos previamente reconocidos por inmunoglobulinas.

b) *Vía alternativa*. Asociada al sistema innato. No requiere la presencia de complejos inmunes para su activación.

Vía clásica

Los componentes de la vía clásica son todos glicoproteínas del plasma; se los designa con un número precedido por la letra C (C1 a C9) (tabla 30-2). Los componentes C1, C2 y C4 son exclusivos de esta vía; C3 es común para las vías clásica y alternativa. C5 a C9 forman el llamado *complejo de ataque lítico* o *complejo de ataque de membrana*, que se forma en ambas vías.

Estructura del componente C1. El primer componente es un complejo de tres glicoproteínas diferentes: C1q, C1r y C1s. La molécula de C1q está formada por 18 cadenas de 217 restos aminoacídicos, agrupadas en 6 subunidades de 3 cadenas distintas (A, B y C) cada una. Las cadenas polipeptídicas tienen una composición muy similar a la del colágeno en la porción que comprende los primeros 81 residuos. En este sector de la molécula hay una glicina cada tres aminoácidos y frecuentes hidroxiprolinas. Las cadenas se asocian en triple hélice similar a la del colágeno (pág. 49). Las porciones restantes de las tres cadenas forman una estructura globular. En consecuencia, cada subunidad trimérica de C1q es elongada, fibrilar en su porción inicial y globulosa en un extremo. El tallo fibrilar no es recto; se quiebra en su parte media formando un ángulo obtuso (fig. 30-13 A). En la molécula de C1q las seis subunidades se disponen con sus tallos paralelos, en haz, en la porción inicial y luego divergen radialmente; el conjunto semeja un ramillete de flores (fig. 30-13 B).

Las seis cabezas globulares de la proteína C1q poseen sitios de unión para la región Fc de inmunoglobulinas. Esta unión no puede realizarse con anticuerpos libres, sino con los fijados a antígeno. Posiblemente en el complejo inmune se producen cambios conformacionales de la Ig que permiten su reconocimiento por C1q. La unión de C1q a complejos antígeno-anticuerpo aislados es muy débil. La fuerza de la unión aumenta notablemente cuando se encuentran múltiples regiones Fc próximas, como sucede en los agregados inmunes.

No todas las inmunoglobulinas tienen la misma capacidad para fijar C1q. La IgG_3 es la de mayor afinidad; le siguen IgG_1 e IgG_2. IgG_4 no se une a C1q. Cuando las IgM están unidas a antí-

Tabla 30-2. Componentes del sistema del complemento.

	Masa(*kDa*)	N° de cadenas antes de activación	Concentración en plasma (*mg/dL*)	Sustrato hidrolizado por la forma activa	Productos de hidrólisis
Vía clásica					
C1q	462	18 (6A, 6B, 6C)	8,0	-	-
C1r*	83	1	5,0	C1r, C1s	C1r
C1s*	83	1	5,0	C4, C2	C1s
C4	205	3 (α, β, γ)	60,0	-	C4a-C4b
C2	102	1	2,0	C3, C5	C2a-C3b
C3	185	2 (α, β)	130,0	-	C3a-C3b
Vía alternativa					
Factor D*	24	1	0,1	Factor B	-
Factor B*	92	1	21,0	C3, C5	Factor B activado
Properdina	220		2,0	-	-
C3	185	2 (α, β)	130,0	-	C3a-C3b
Componentes terminales					
C5	190	2 (α, β)	7,0	-	C5a-C5b
C6	120	1	6,4	-	-
C7	110	1	5,6	-	-
C8	150	3 (α, β, γ)	5,5	-	-
C9	71	1	5,9	-	-

*Los componentes señalados con asterisco son zimógenos o proenzimas.

genos de gran tamaño se ligan firmemente a C1q. Las restantes clases de Ig no se asocian a C1q.

Las otras dos proteínas del complejo son C1r y C1s. Sus moléculas son alargadas, con dos extremos globulosos desiguales. Ambas son zimógenos o proenzimas con el sitio catalítico localizado en el extremo de mayor volumen. En el plasma forman asociaciones lineales de fórmula $C1r_2$-$C1s_2$ (fig. 30-13 C) que se introducen en el espacio formado por los tallos de C1q, plegados de manera tal que los extremos globulares más grandes de C1r y C1s (los que poseen el sitio catalítico) quedan todos próximos en el interior del "ramillete" (fig. 30-13 D). La formación de este complejo es dependiente de Ca^{2+}.

Activación de C1. Normalmente C1 se encuentra en estado inactivo por su asociación con una proteína inhibidora existente en el plasma

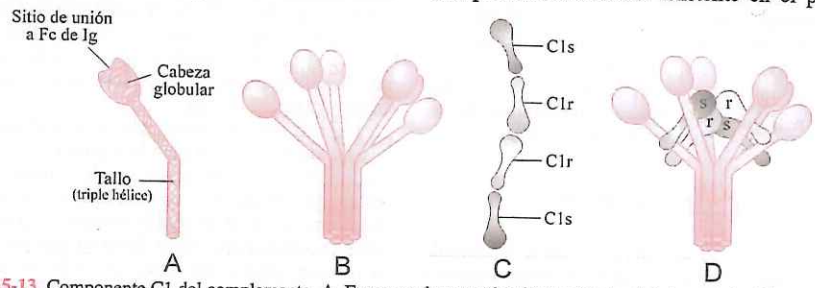


Fig. 25-13. Componente C1 del complemento. **A.** Esquema de una subunidad estructural de la proteína C1q resultante de la asociación de tres cadenas polipeptídicas (A, B y C). En su primer tramo, estas cadenas se asocian en triple hélice; es el tallo fibrilar que se quiebra en ángulo obtuso. Los extremos C-terminales de las tres cadenas adquieren conformación globular y forman una "cabeza" donde reside el sitio de unión a la porción Fc de Ig. **B.** Esquema de la molécula de $C1_q$, constituida por seis subunidades como la representada en A, dispuestas en ramillete. **C.** Asociación lineal de dos subunidades C1r y dos C1s (complejo $C1r_2$-$C1s_2$). En el extremo globular mayor de C1r y C1s se encuentra el sitio catalítico de estas proenzimas. **D.** Componente C1 completo. El complejo $C1r_2$-$C1s_2$ se pliega entre las subunidades del ramillete formado por las C1q con las cabezas globulares mayores de C1r y C1s dirigidas hacia el interior.

(*C1-inh*) que previene la activación del zimógeno C1r. El efecto inhibitorio de C1-inh es anulado cuando C1 se une a complejos antígeno-anticuerpo. La interacción de dos o más cabezas globulares de C1q con zonas Fc de Ig induce un cambio conformacional en C1, que lo libera de la inhibición por C1-inh. Se produce entonces autoactivación de la proenzima C1r, que se convierte en proteasa. A su vez, esta enzima activa al zimógeno C1s e inicia la cascada de reacciones proteolíticas.

El mecanismo de activación de C1r y C1s es similar al de las proteasas digestivas; los zimógenos se convierten en enzima activa después de sufrir hidrólisis de determinadas uniones peptídicas en su molécula. C1r y C1s activados[2], al igual que otras enzimas del complemento, son serina proteasas.

Las etapas de la vía clásica son presentadas en el esquema de la figura 30-14.

Activación de C2. C1s cataliza la hidrólisis del componente C4, el cual se separa en dos fragmentos, uno pequeño, C4a, y otro mayor, C4b. Este último tiene capacidad para establecer enlaces covalentes con superficies vecinas, preferentemente las de antígenos unidos a los anticuerpos que iniciaron la activación de C1. C4b interactúa con otro componente del complemento, la proenzima C2. La unión de C4b y C2 es dependiente de Mg^{2+}. C1s actúa también sobre C2, y lo divide en C2a y C2b. C2a tiene actividad serina proteasa; el fragmento C2b se libera y sobre la membrana queda el complejo C4bC2a, denominado *C3 convertasa*.

Activación de C3. El componente C3 tiene una posición clave en el sistema; a él convergen la vía clásica y la alternativa. Es una proteína relativamente abundante en plasma; su concentración normal es de 130 mg/dL.

En la vía clásica, el complejo C4bC2a se une a C3 y lo activa por ruptura hidrolítica. Se forman dos fragmentos: uno pequeño, llamado C3a, se separa; el otro, C3b, se asocia a C4bC2a en el complejo C4bC2aC3b. La escisión del fragmento C3a deja al descubierto un grupo tioéster en C3b, inaccesible en la molécula de C3 nativa. El tioéster es extremadamente reactivo y se une con facilidad a grupos hidroxilo o amina para formar ésteres o amidas respectivamente. Esto permite a C3b unirse covalentemente a moléculas de superficies próximas.

Activación de C5. Como la de anteriores componentes, la activación del componente C5 es el resultado de la hidrólisis de una unión peptídica en su molécula. El complejo C4bC2aC3b, también llamado *C5 convertasa*, tiene actividad proteolítica en su porción C2a. El componente C5 es escindido en C5a, porción menor, y C5b, primer componente del complejo de ataque lítico.

[2] Los componentes del sistema del complemento que son activados, es decir, que tienen actividad proteolítica, se distinguen con una línea horizontal sobre las siglas que los representan.

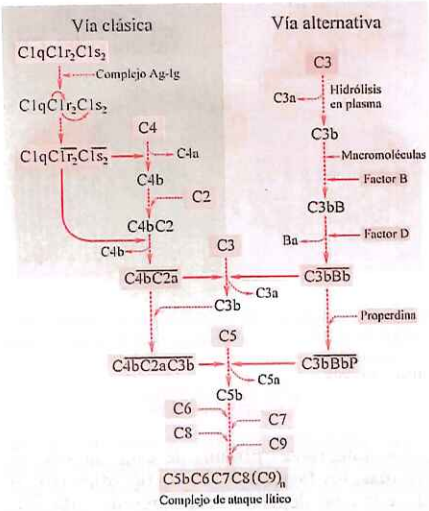


Fig. 30-14. Etapas de las vías clásica y alternativa de activación del complemento. Los componentes en recuadro rojo son proteasas y las flechas en línea continua indican acción hidrolítica.

Complejo de ataque de membrana

Las cinco glicoproteínas C5b a C9 forman un complejo de masa cercana a $2 \cdot 10^6$ Da, responsable de la acción lítica final sobre las células. El complejo resulta del ensamble sucesivo de sus componentes. C5b se asocia a C6 y luego a C7, que se fijan a la superficie de la membrana; entonces se agrega C8.

El complejo C5bC6C7C8 actúa como receptor y catalizador de la formación de poros o canales transmembrana. Estos canales se forman por polimerización de un número variable de subunidades del componente C9 (hasta 18) insertadas en la bicapa lipídica (fig. 30-15).

El complejo $C5bC6C7C8(C9)_n$ queda incluido en la membrana como proteína integral. El libre flujo de moléculas e iones pequeños a través de los poros formados produce lisis osmótica de la célula.

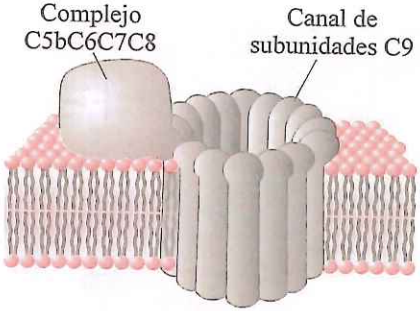


Fig. 30-15. Esquema de un complejo de ataque lítico $C5bC6C7C8(C9)_n$. Las subunidades C9 forman un canal transmembrana.

Vía alternativa

Los integrantes propios de esta vía son tres proteínas, los factores B, D y properdina (P). Su activación no depende de la presencia de anticuerpos, sino de macromoléculas de superficie en algunas células y partículas. Por esta razón, cuando no se conocía la relación del complemento con el sistema adaptativo, se había pensado que estaba asociada sólo al sistema innato.

Normalmente, en el plasma ocurre hidrólisis de C3 y se forman muy pequeñas cantidades de C3b en forma continua. Este C3b es rápidamente inactivado por diversos agentes, entre los cuales se cuentan los factores H e I, proteínas de control existentes en plasma. Esta situación equilibrada entre producción e inactivación de C3b puede ser alterada por la presencia de macromoléculas (por ejemplo, polisacáridos, lipopolisacáridos) de algunos microorganismos o células a las cuales se fija C3b y escapa a la acción de los factores H e I. En estas condiciones, el factor B, proenzima del plasma, se une a C3b. En presencia del factor D, una proteasa, B es hidrolizado en dos trozos, Ba y Bb. Este último es una serina proteasa; unido a C3b forma el complejo C3bBb o *C3 convertasa*, de acción idéntica a la de C3 convertasa de la vía clásica (C4bC2a). La properdina (P) se une a C3b en el complejo, lo estabiliza y prolonga su vida media. Además, C3bBbP actúa como *C5 convertasa*.

Ambas vías convergen en C3b; las etapas siguientes (formación del complejo de ataque de membrana) son las mismas para las vías alternativa y clásica (fig. 30-14).

Vía de lectina. Una tercera vía, homóloga de la clásica, puede ser activada independientemente de anticuerpos. Es iniciada por la *proteína de unión a manano* (MBP, de *mannan binding protein*) o *lectina fijadora de manano*, de estructura similar a C1q, presente en plasma sanguíneo asociada a serina proteasas homólogas a C1r y C1s. La MBP puede unirse a grupos manosa terminales en la superficie de bacterias y activar las enzimas proteolíticas que la acompañan; éstas actúan sobre C4 y C2 y generan C3 convertasa como en la vía clásica.

Factores de regulación

Las vías en cascada tienen un efecto multiplicador; una molécula de la proteasa inicial activa varias moléculas de la proenzima siguiente y la respuesta se amplifica en forma progresiva. Estas reacciones deben ser controladas, pues de lo contrario el proceso sólo se detendría con el agotamiento de los componentes. En función reguladora intervienen varias proteínas inhibitorias, cuya acción se ejerce a diferentes niveles.

Se ha mencionado al inhibidor de C1 (C1-inh). Además se encuentran los factores H e I, que actúan sobre C3b, y otras proteínas inhibitorias de la formación de C3bBb en la vía alternativa. El control del complejo de ataque de membrana es mediado por varios agentes que impiden el ensamble, de los cuales el más eficiente es la proteína S.

Funciones del sistema del complemento

Ambas vías de activación terminan con el ensamble del complejo de ataque de membrana, cuya intensa acción citolítica lleva a la destrucción del agente extraño. Esta acción se ejerce sólo en membranas adyacentes al sitio de activación, ya sea las de antígenos a los cuales se unieron Ig (vía clásica) o las que poseen macromoléculas activadoras (vía alternativa). Los fragmentos C3b no fijados a esas superficies próximas quedan libres en la fase líquida, donde distintos factores anulan rápidamente su capacidad para establecer uniones covalentes con otras moléculas. Por esta razón, no se dañan células del propio individuo.

Un importante papel del complemento es el de eliminar complejos antígeno-anticuerpo y prevenir su acumulación. En personas con defectos genéticos que reducen o anulan la síntesis de C1, C2, C3 y C4, es común observar trastornos producidos por el depósito de agregados antígeno-anticuerpo (ej.: glomerulonefritis, artritis reumatoidea).

Otras acciones son mediadas por productos intermedios de las vías de activación. Los frag-

mentos C3b y C4b tienen capacidad para unirse covalentemente a partículas o células y recubrir su superficie, fenómeno llamado *opsonización*. Distintas células fagocitarias (macrófagos, monocitos y leucocitos polimorfonucleares) tienen receptores para C3b y C4b. La presencia de estas moléculas en la superficie de partículas o células facilita su adherencia a los fagocitos y su posterior ingestión por éstos, lo que promueve la eliminación no sólo de elementos patógenos, sino también de células o restos celulares señalados para su destrucción.

Los fragmentos C3a, C4a y C5a, polipéptidos de 9 kDa estructuralmente homólogos entre sí, son designados *anafilatoxinas*. Se unen a receptores específicos existentes en células cebadas, basófilos, plaquetas y células de músculo liso y desencadenan múltiples acciones: liberación de histamina, leucotrienos y otros mediadores químicos que producen vasodilatación local, aumento de la permeabilidad vascular (lo cual facilita la producción de edema), liberación de enzimas lisosomales y contracción de músculo liso. C5a tiene además acción *quimiotáctica*; induce la migración de leucocitos hacia el lugar donde ocurre la activación del complemento. Los efectos mencionados son característicos de la reacción inflamatoria.

Las anafilatoxinas se inactivan si se elimina una arginina de su extremo C-terminal. La *carboxipeptidasa N*, enzima existente en el plasma, cataliza la reacción y ejerce el control de estas sustancias.

La importancia del complemento se manifiesta por la tendencia a sufrir infecciones recurrentes de las personas con deficiencias de componentes del sistema.

Defectos en la activación del complemento son responsables de muchas enfermedades inflamatorias, degenerativas o autoinmunes. Por ejemplo, mutaciones en los genes de los factores H, I, B y CD46 han sido relacionadas con patologías como el síndrome urémico hemolítico atípico, lupus eritematoso sistémico, edema angioneurótico y hemoglobinuria nocturna paroxística.

INMUNIDAD CELULAR

Linfocitos T

Los linfocitos T son los efectores de la inmunidad mediada por células. Están dotados de receptores que reconocen selectivamente al antígeno y se unen a él. A diferencia de las inmunoglobulinas, cuyos sitios de unión fijan antígenos libres en el medio extracelular, los receptores de linfocitos T sólo detectan al antígeno cuando éste les es "presentado" por otra célula accesoria.

Se distinguen dos tipos de linfocitos T, con funciones diferentes:

a) *Células T auxiliares* (T_H) (en inglés, *helper T cells*). Cuando son estimuladas, secretan al medio factores que activan la proliferación y diferenciación de otras células. Un grupo de esta clase de linfocitos T interactúa con células B que han fijado antígeno, induce su multiplicación y diferenciación, y la síntesis y secreción de anticuerpos. Otro grupo se relaciona con fagocitos y colabora en su función de destruir agentes extraños.

b) *Células T citotóxicas* (T_C) (en inglés, *killer T cells*). Son responsables de la destrucción de células infectadas por virus u otros agentes patógenos. Tanto las células T_H como T_C reconocen al antígeno sólo cuando es presentado unido a proteínas específicas en la superficie de otra célula.

Se han descripto también células T *supresoras* (T_S) con capacidad para inhibir la respuesta inmune; desempeñan un papel regulador. No se considera que representan un grupo de células T.

Aproximadamente 15% de los linfocitos circulantes no pertenecen a los tipos B o T, pero ejercen funciones de defensa. Son las células *citotóxicas* o *"matadoras" naturales* (en inglés, *natural killer cells*, NK); tienen propiedades citotóxicas no específicas, pueden reconocer y destruir células tumorales e infectadas por virus.

Las células T se originan a partir de precursores de la serie linfoblástica en la médula ósea, migran tempranamente hacia el timo, donde se diferencian y convierten en linfocitos T maduros. Una vez completada su diferenciación en el timo, las células T pasan a la circulación y se alojan en órganos linfáticos secundarios, donde también se encuentran linfocitos B.

Durante las etapas de su maduración, los linfocitos T expresan distintas proteínas en su superficie, que pueden ser identificadas y utilizadas como "marcadores" para determinar el estadio de diferenciación y el tipo de célula. Entre las diversas proteínas de esta clase sólo citaremos tres: CD3, CD4 y CD8. CD3 es un complejo de seis cadenas polipeptídicas presente en la membrana de todas las células T maduras; acompaña a los receptores específicos de las células T y es necesario para su expresión en la superficie celular. CD4 y CD8 permiten distinguir células T con diferentes funciones. En general, los linfocitos T auxiliares (T_H) poseen CD4, razón por la cual a este tipo de células suele designárselas T_H $CD4^+$ o simplemente T4. Los linfocitos T citotóxicos (T_C) tienen CD8 en su membrana plasmática, de ahí el nombre de células T_C $CD8^+$ o T8.

Receptor de células T

La gran mayoría de los linfocitos T circulantes tiene un receptor formado por dos cadenas diferentes (α y β). Las cadenas α y β son glicoproteínas de 46 y 41 kDa respectivamente; poseen dos dominios globulares de unos 110 aminoácidos cada uno, seguidos de un segmento que atraviesa la membrana plasmática. De los dos dominios de cada cadena, el primero presenta diferencias en la secuencia de aminoácidos cuando se lo compara con los correspondientes de otras células T, razón por la cual se lo llama *zona variable*. El segundo dominio tiene una estructura más conservada, es la *región constante*. Los dominios variables de α y β están dispuestos uno frente al otro y entre ambos forman el sitio de reconocimiento del antígeno.

En cada uno de los dominios variables y constantes existe un enlace disulfuro intracatenario. Además, hay puentes S–S intercatenarios que enlazan cisteínas situadas cerca de la membrana. Puede advertirse la homología estructural de la porción extracelular del receptor con la de un fragmento Fab de inmunoglobulinas. A continuación del dominio constante se extiende un trozo de 22 restos aminoacídicos, predominantemente hidrófobos, que atraviesa la bicapa lipídica de la membrana plasmática del linfocito T. Un segmento de 12 residuos hidrófilos en el extremo C-terminal está inmerso en el citoplasma (fig. 30-16). El receptor αβ se encuentra en más del 95% de las células T periféricas y en la mayoría de timocitos. Algunas células T poseen un receptor constituido por cadenas γ y δ, distintas de α y β, pero semejantes en su estructura básica. Las células T con receptores γδ representan una pequeña proporción de los linfocitos en el timo y en órganos linfoides secundarios de epitelio intestinal, lengua y útero.

Existe gran diversidad en la configuración del sitio de unión del antígeno formado por los dominios variables. La síntesis de esta variedad de receptores es controlada por un conjunto de genes que sufren reordenamientos semejantes a los descritos en los loci de Ig.

A semejanza de los genes de Ig, los correspondientes a regiones variables de las cadenas de receptores T están dispuestos en conjuntos separados (V y J para la cadena α; V, D y J para la β). Durante la diferenciación de linfocitos T en el timo tiene lugar una reorganización del ADN de esos genes y se produce recombinación por un mecanismo similar al indicado para Ig. Las posibilidades de generar proteínas diferentes aumentan por la existencia de imprecisiones en los ensambles D-J, V-DJ y V-J, como sucede en genes de Ig. También funciona el mecanismo de diversificación catalizado por *desoxinucleotidil transferasa terminal*. El potencial para la síntesis de receptores con diferente especificidad es tan grande como el calculado para inmunoglobulinas.

El receptor de linfocitos T, sea αβ o γδ, está siempre asociado a un conjunto de polipéptidos de estructura muy conservada, el complejo CD3, agrupación de los polipéptidos γ, δ, ε y ζ que establece una interacción estable con el receptor. Las cadenas γ, δ y ε son miembros de la superfamilia de Ig, con un dominio externo que contiene un puente disulfuro intracatenario. Las ζ tienen un segmento extracelular más pequeño. Todos los polipéptidos del complejo CD3 poseen

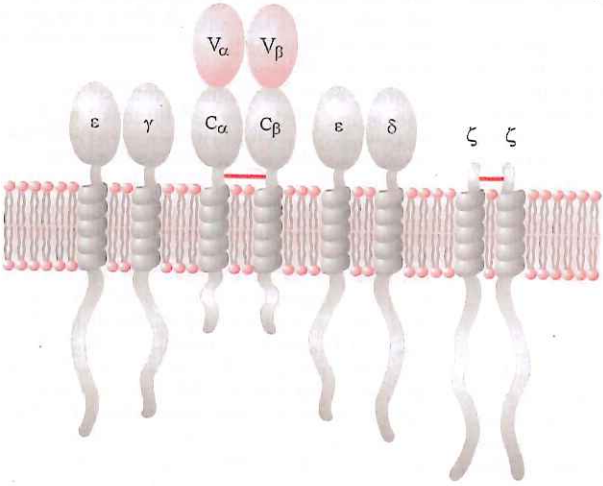


Fig. 30-16. Esquema del receptor de células T y complejo CD3.

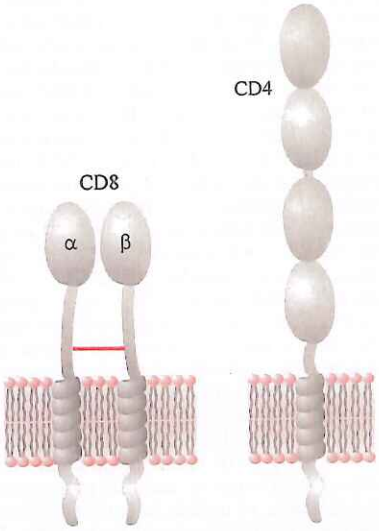


Fig. 30-17. Correceptores CD8 y CD4 de células T.

un trozo transmembrana y un dominio citoplasmático de 40 o más aminoácidos (fig. 30-16), que puede ser fosforilado por tirosina quinasa. CD3 está involucrado en la transmisión de señales al interior de la célula cuando el receptor ha fijado el antígeno. Las cadenas γ y δ del receptor de una pequeña proporción de células T son diferentes de las de igual nombre en el complejo CD3.

La agrupación de polipéptidos del receptor de células T (TCR) incluye dos heterodímeros αβ, con dominios variables y constantes hacia el espacio extracelular. Las porciones variables de cada dímero αβ forman el sitio de unión del antígeno y da especificidad al receptor. Los polipéptidos del complejo CD3 están comprometidos en la transmisión de señales al interior de la célula. La estequiometría del conjunto es $(\alpha\beta)_2$, γ, δ, ε_2, ζ_2 (fig. 30-16).

CD4 y CD8 juegan un papel importante en el reconocimiento diferencial de proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (ver sección siguiente). Durante el reconocimiento del antígeno, CD4 y CD8 se asocian con los componentes del receptor de linfocito T. CD4 es una cadena polipeptídica con cuatro dominios extracelulares tipo Ig, un segmento transmembrana y un dominio citoplasmático fosforilable por tirosina quinasa (fig. 30-17). Participa en transducción de señales al interior del linfocito. CD8 es un heterodímero de cadenas α y β unidas por un puente disulfuro. Cada subunidad tiene un dominio tipo Ig en su porción externa, un segmento transmembrana y el dominio citosólico, que puede unir una tirosina quinasa (fig. 30-17). CD4 y CD8 actúan como correceptores.

Complejo mayor de histocompatibilidad

Los linfocitos T no pueden reconocer antígenos si éstos no están unidos a proteínas específicas de otras células accesorias. Estas proteínas específicas son codificadas por los genes del denominado *complejo mayor de histocompatibilidad* (CMH, en inglés MHC). En el hombre, a estas proteínas se las designa también con las siglas HLA (de *human leucocyte antigen*). Existen tres clases de proteínas sintetizadas bajo control de este complejo (I, II y III). Nos referiremos a las dos primeras; la tercera comprende un conjunto de diversas proteínas que incluye algunos componentes del sistema complemento y otras relacionadas con el procesamiento de antígenos.

Proteínas clase I. Están formadas por dos cadenas polipeptídicas (α y β_2-microglobulina). La cadena α es una proteína integral de membrana de 45 kDa, unida a carbohidratos. Se encuentra en todas las células nucleadas. Posee tres dominios, de unos 90 restos aminoacídicos cada uno, α_1, α_2 y α_3, numerados a partir del extremo N-terminal. Las diferencias de secuencia de aminoácidos entre distintas proteínas clase I radican principalmente en los dominios α_1 y α_2; el α_3 es el más conservado. A continuación del dominio α_3 se extiende un segmento transmembrana, de 25 aminoácidos predominantemente hidrófobos y luego un tramo

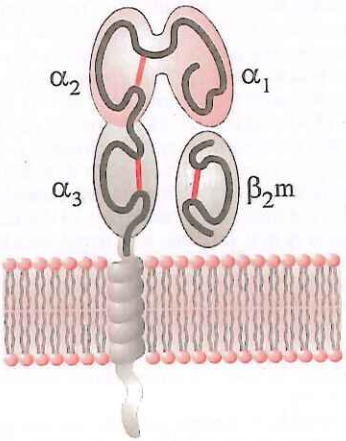


Fig. 30-18. Esquema de proteína del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I.

hidrofílico, de 30 a 40 residuos aminoacídicos del extremo C-terminal, intracitoplasmático (fig. 30-18), que puede ser fosforilado por tirosina quinasa.

La cadena α está asociada no covalentemente a otra más pequeña, la β_2-microglobulina (β_2m), de 99 aminoácidos (12 kDa), no inserta en la membrana. La presencia de β_2m es esencial para la expresión de CMH clase I en la superficie celular. Los dominios α_2 y α_3 y la β_2m poseen un puente disulfuro intracatenario que une cisteínas separadas por unos 60 residuos.

Estudios cristalográficos con rayos X han brindado una imagen tridimensional de proteínas del CMH clase I. El sitio de fijación del antígeno reside en la zona de cadena α correspondiente a los dominios α_1 y α_2, donde se forma una hendidura flanqueada por dos hélices α y cerrada en el fondo por ocho láminas β antiparalelas (véase fig. 3-22). En el nicho así delimitado se aloja el antígeno.

En humanos se encuentran tres subclases distintas de proteínas HLA clase I, codificadas por tres *loci* diferentes HLA-A, HLA-B y HLA-C (se ha demostrado la existencia de genes adicionales: E, F, G). Difieren entre sí en la secuencia de los dominios α_1 y α_2, pero las tres poseen la misma β_2-microglobulina. HLA-A, HLA-B y HLA-C se expresan simultáneamente en todas las células, excepto en eritrocitos y en el sincicio trofoblasto.

Hay un marcado polimorfismo de estas proteínas en la población; se han identificado numerosos alelos para cada una de ellas. Dada la extensa variabilidad existente, la mayoría de las personas son heterocigotas en los tres *loci*. Como los alelos son codominantes, un individuo puede expresar en sus células hasta seis proteínas clase I distintas, dos de cada una de las subclases A, B y C.

Proteínas clase II. Son glicoproteínas integrales de membrana, formadas por una cadena α (33 kDa) y otra β (28 kDa). Ambas subunidades están asociadas no covalentemente y tienen homologías estructurales. Poseen dos dominios extracelulares y un segmento transmembrana. Los dos dominios de la cadena β y el dominio de la cadena α más próximo a la membrana tienen un puente disulfuro intracatenario. Al segundo dominio le sigue un corto segmento hidrofílico que se continúa con el trozo intramembrana, de unos 30 residuos hidrofóbicos. Finalmente, el extremo C-terminal es un segmento intracitoplasmático de unos 14 aminoácidos hidrofílicos (fig. 30-19).

Es notable la homología entre inmunoglobulinas, receptores de células T y proteínas clase I y II del complejo mayor de histocompatibilidad; especialmente la estructura de los dominios con puentes -S-S- intracatenarios se repite en todas esas moléculas. Es probable que los genes responsables de su síntesis se hayan originado por sucesivas duplicaciones de un gen ancestral común. Todos ellos integran una superfamilia de genes.

Los dominios α_1 y β_1 forman un nicho similar al de dominios α_1 y α_2 de proteínas CMH clase I, flanqueado por dos hélices α, sobre un fondo de láminas β antiparalelas. Los péptidos antigénicos se disponen extendidos en este nicho. Las proteínas clase II pueden alojar péptidos de mayor longitud que los aceptados por CMH I. A diferencia de las proteínas del CMH clase I, presentes en todas las células (excepto glóbulos rojos), las de clase II sólo se expresan en la superficie de macrófagos, monocitos, linfocitos B y células dendríticas, a las cuales se las denomina *células presentadoras de antígeno* (CPA).

Existen tres subclases diferentes de HLA clase II : DR, DQ y DP. Como las proteínas clase I, éstas también tienen un marcado polimorfismo en la población; es posible la existencia de seis o más proteínas CMH clase II en las CPA. Las CMH clase II son codificadas por tres grupos de genes (DR, DQ y DP), cada uno de los cuales contiene información al menos para una cadena α y una β. Es común la existencia de más de un gen funcional de esos polipéptidos, especialmente del β; de allí que puedan producirse más de seis proteínas CMH clase II.

Dada la variabilidad genética existente en el CMH, es muy raro el hallazgo de dos individuos

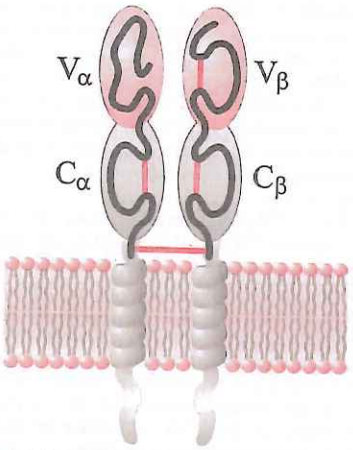


Fig. 30-19. Esquema del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II.

con todas sus proteínas HLA idénticas, a excepción del caso de gemelos univitelinos.

Los genotipos CMH se pueden identificar mediante reacciones serológicas. Esta identificación tiene importancia en la práctica de injertos de órganos. El trasplante de tejidos cuyas proteínas HLA sean reconocidas como extrañas por el paciente receptor inducirá reacciones de rechazo. Los principales efectores en el rechazo de órganos incompatibles son los linfocitos T.

Funciones de las proteínas del CMH o HLA. La función de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad es la de presentar péptidos antigénicos a los linfocitos T. Las proteínas HLA actúan como moléculas guía para las células T en el reconocimiento del antígeno unido a ellas.

El antígeno sólo es "visto" por células T cuando está asociado a proteínas del CMH de células presentadoras del mismo individuo. A este fenómeno se lo llama *restricción por CMH*. El antígeno unido a células con HLA distintas de las del propio sujeto, no es detectado.

Según la clase de proteínas del CMH que reconocen, las células T se dividen en subpoblaciones funcionalmente diferentes: en general, los linfocitos T auxiliares (T_H) reconocen el antígeno unido a HLA clase II, mientras los citotóxicos (T_C) se unen a antígenos fijados a HLA clase I.

Los receptores de células T deben reconocer no sólo el antígeno sino también la proteína del CMH portadora. Los correceptores CD4 o CD8 colaboran en el reconocimiento de la porción invariante de CMH.

Reconocimiento del antígeno

La detección del antígeno por células T difiere sustancialmente de la de células B y anticuerpos. Los linfocitos T son incapaces de fijar antígenos libres; éstos deben estar asociados a proteínas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad. El reconocimiento por células B o por anticuerpos secretados es la consecuencia de una interacción directa ligando-receptor; en cambio, la célula T debe formar un complejo ternario receptor-antígeno-proteína del CMH.

Las características de los determinantes antigénicos o epitopos reconocidos por inmunoglobulinas y linfocitos T también difieren. En general, los anticuerpos se unen a epitopos expuestos en la superficie de la molécula antigénica; por ello es muy importante el mantenimiento de la conformación nativa de ésta para la obtención de una respuesta inmune humoral. Por el contrario, las células T pueden reconocer proteínas desnaturalizadas o, mejor, trozos pequeños de la molécula, frecuentemente poco accesibles en la proteína nativa. La estructura terciaria del antígeno, importante para la fijación de anticuerpos, no es crítica para los receptores T; éstos se fijan generalmente a péptidos cortos, de 8 a 15 aminoácidos, de estructura lineal extendida.

Procesamiento del antígeno

Los linfocitos T son activados por su unión a un antígeno procesado por la célula presentadora y asociado a moléculas del CMH.

Se han descripto dos vías de procesamiento, una para antígenos producidos en la célula presentadora (endógenos) y otra para antígenos exógenos.

Vía endógena o biosintética. Corresponde a proteínas elaboradas dentro de la célula presentadora. Los antígenos proceden de proteínas diferentes de las normales del individuo; por ejemplo, sintetizadas por células infectadas por virus. Estas moléculas "extrañas" son captadas en el citosol por *proteasomas* (pág. 328) dentro de los cuales se hidrolizan en péptidos de 5 a 15 aminoácidos. Estos péptidos, liberados en el citosol, son conducidos hacia el retículo endoplásmico (RE) e introducidos en sus cisternas por transportadores del tipo ABC (pág. 217) llamados TAP1 y TAP2.

Las cadenas α y β_2m recién sintetizadas también ingresan en el RE, donde se ensambla el CMH clase I. Dentro de las cisternas los péptidos antigénicos se asocian con moléculas CMH I que pueden reconocerlos. Este proceso es asistido por chaperonas como la *calnexina*. El complejo CMH I-Ag pasa del RE al sistema de Golgi. Finalmente se desprende en vesículas que son transferidas a la membrana plasmática de la célula presentadora, en la cual queda expuesto y puede interaccionar específicamente con el receptor de células T_C. La figura 30-20 presenta esquemáticamente el proceso.

Vía exógena o *endocítica*. El antígeno procede del exterior de la célula presentadora. Puede ser captado por el receptor IgM o IgD de membrana de un linfocito B o directamente captado del medio por otras células. En ambos casos el antígeno es internado por endocitosis o pinocitosis (págs. 220 y 222) y alojado en vesículas (endosomas) cuyo interior se acidifica. El endosoma se fusiona con un lisosoma cargado de enzimas hidrolíticas que degradan la proteína antigénica en péptidos pequeños. Las cadenas α y β se introducen en

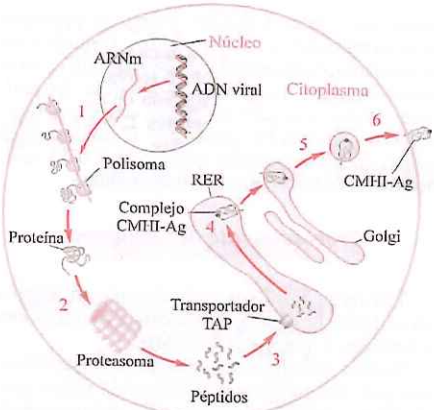


Fig. 30-20. Procesamiento del antígeno (Ag) por la *vía endógena*. Se representa el caso de una célula infectada por virus. **1.** La célula transcribe el ADN viral incorporado en su genoma y produce ARNm que pasa al citosol, donde sirve de molde para la síntesis de proteína del virus. **2.** La proteína liberada en el citosol es introducida en proteasomas e hidrolizada en péptidos pequeños. **3.** Los péptidos ingresan en el retículo endoplásmico rugoso (RER) a través de transportadores TAP. **4.** Inmediatamente después de su síntesis en el citosol, las cadenas α y β_2m son incorporadas al RER donde forman el CMH clase I que se une a un péptido antigénico, asistido por la chaperona *calnexina*. **5.** El complejo CMH I-AG pasa al sistema de Golgi y luego se desprende en una vesícula. **6.** La vesícula se fusiona con la membrana plasmática y el complejo CMH I-Ag queda expuesto al medio exterior.

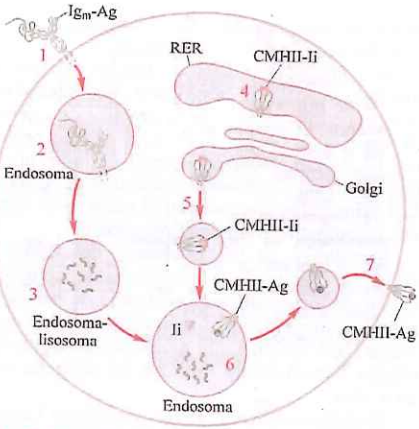


Fig. 30-21. Procesamiento de antígenos por la *vía exógena*. Se muestra el caso de un antígeno (Ag) presentado por un linfocito B. **1.** El epitopo de una proteína antigénica se ha fijado al paratopo de Ig$_m$ inserta en la membrana del linfocito. **2.** El complejo Ig-Ag es internado por endocitosis en un endosoma. **3.** El endosoma, ácidificado en su interior, se fusiona con un lisosoma; el antígeno es degradado en péptidos pequeños. **4.** Cadenas α y β penetran en el RER y forman el CMH II que une la cadena invariante (Ii). **5.** El complejo CMH II-Ii pasa del RER al aparato de Golgi y de allí se desprende en vesículas de transporte que se fusionan con el endosoma-lisosoma. **6.** En el endosoma se separa Ii y se une un péptido antigénico reconocido por el CMH II. **7.** El complejo CMH II-Ag es insertado en la membrana plasmática y queda expuesto al exterior.

el retículo endoplásmico rugoso (RER), donde, después de haberse asociado para formar el CMH clase II, se unen a un polipéptido llamado *cadena invariante* (Ii). Pasan al Golgi y finalmente al endosoma-lisosoma en el cual la proteína extraña ha sido degradada; CMH II libera la cadena Ii y fija un péptido antigénico que posea la estructura adecuada. El complejo CMH II-Ag es transferido a la membrana plasmática y expuesto al exterior (fig. 30-21).

La unión del péptido procesado a la proteína del CMH no tiene requerimientos estructurales tan selectivos como los de receptores T o Ig; un mismo tipo de molécula HLA puede presentar diferentes antígenos. Por eso una cantidad relativamente pequeña de moléculas HLA es suficiente para presentar la enorme variedad de antígenos posibles. Sin embargo, no todas las variantes de HLA son igualmente eficientes; algunas son pobres presentadoras de antígenos y ello disminuye la capacidad de respuesta inmune de los individuos que las poseen.

En la interacción del receptor con el complejo antígeno-HLA participan las moléculas accesorias CD4 y CD8, que se asocian a zonas no variables de CMH. En términos generales, CD4 presente en linfocitos T_H, interactúa con moléculas HLA clase II y CD8, en células T_C, con proteínas clase I.

Después que el receptor ha reconocido al antígeno, su proliferación clonal y diferenciación dependen de sustancias liberadas al medio por la célula presentadora o por los propios linfocitos T. Estas sustancias, designadas *citoquinas*, serán consideradas más adelante.

Al estimularse la proliferación clonal se generan linfocitos T auxiliares, citotóxicos, y células T de memoria, todos ellos con receptores de especificidad idéntica a la de la célula T original.

Activación de linfocitos T

Una vez completado su desarrollo en el timo, los linfocitos T pasan a la circulación, donde eventualmente pueden encontrar una célula presentadora de un antígeno que alguno de los linfocitos T reconoce específicamente. Las células T "vírgenes" son inducidas a multiplicarse y diferenciarse en células T efectoras, que actúan más rápidamente al enfrentarse con complejos CMH-Ag en otras células.

Existen tres clases de células T efectoras con capacidad para detectar antígenos y participar en reacciones inmunitarias: T_C $CD8^+$, T_H1 $CD4^+$ y T_H2 $CD4^+$.

Los antígenos derivados de patógenos que se multiplican dentro de las células son procesados y expuestos en la superficie de las células presentadoras por CMH (o HLA) clase I y detectados por células T citotóxicas (T_C $CD8^+$) que destruyen la célula afectada.

Los antígenos ingresados en la célula por endocitosis, fagocitosis o pinocitosis son procesados e insertados en la membrana plasmática unidos a moléculas CMH clase II y reconocidos por células T auxiliares (T_H $CD4^+$). Estos linfocitos pueden diferenciarse en dos tipos: T_H1 o *inflamatorios*, que activan macrófagos infectados para que éstos destruyan el patógeno invasor, y T_H2, que estimulan a linfocitos B a multiplicarse y diferenciarse en células plasmáticas productoras de anticuerpos. También potencian reacciones alérgicas.

El primer encuentro de un linfocito T virgen con el antígeno resulta en una respuesta primaria y genera células de memoria, que proveen protección en ulteriores invasiones del mismo patógeno.

Activación. La activación de linfocitos T vírgenes exige el reconocimiento de un fragmento peptídico antigénico unido a una molécula del CMH (HLA) y, además, una serie de señales estimulatorias. Sólo las células presentadoras de antígeno (CPA) "profesionales" (macrófagos, células dendríticas y linfocitos B) son capaces de expresar, en adición a las moléculas del CMH, otras vinculadas a sistemas de transmisión de señales que potencian la expansión clonal de linfocitos T y su diferenciación en células efectoras.

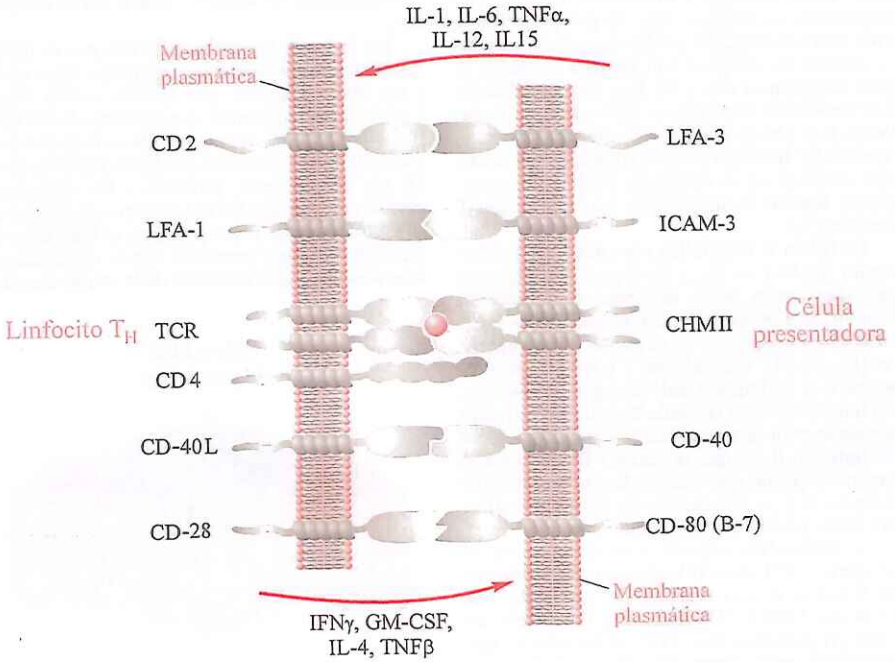


Fig. 30-22. Interacciones linfocito T-célula presentadora. Se indican moléculas comprometidas y citoquinas liberadas en respuesta a las señales generadas por esas interacciones.

Mientras el reconocimiento del complejo CMH-Ag por el TCR es específico, esas moléculas coestimulatorias establecen interacciones no específicas (son comunes a muchas células). Se trata de agentes de adhesión entre células presentadoras y linfocitos T. Las principales de estas moléculas son *selectinas*, *integrinas*, *adresinas* y otras proteínas de la *superfamilia de inmunoglobulinas*. Además de los correceptores CD4, CD8 y CD19, que se asocian a dominios no variables de CMH, también pertenecen a la familia de Ig las *moléculas de adhesión intercelular* (ICAM) que ligan *integrinas LFA* (de *lymphocyte function-associated antigen*) y la glicoproteína *B7* (o *B80*) que se une a *CD28*.

Las señales emitidas desde estas moléculas hacia el interior de las células promueven la síntesis y secreción al medio de sustancias (citoquinas) que actúan como agentes de activación. La figura 30-22 indica algunas de las interacciones y citoquinas responsables de la estimulación de células T.

Activación de linfocitos B. Los linfocitos B maduros vírgenes utilizan como receptores IgM e IgD de membrana. Estas células circulan durante varias semanas y finalmente mueren si no encuentran un antígeno afín. El primer estímulo para su multiplicación y diferenciación se produce cuando un antígeno con epitopo adaptable al sitio de unión se une a las Ig_m de una célula B. Las moléculas asociadas a IgM e IgD de membrana (los heterodímeros $\alpha\beta$) emiten señales al interior del linfocito. En la mayoría de los casos, este estímulo no es suficiente por sí solo; se requiere además la interacción con una célula T auxiliar (T_H).

La célula B internaliza por endocitosis el antígeno fijado a su Ig_m y lo degrada en péptidos pequeños como se ha descripto en la sección anterior. Los péptidos se unen a moléculas HLA clase II y el complejo es expuesto en la superficie (fig. 30-21). Un linfocito T cuyo receptor reconozca al complejo CMH II-Ag se une a éste. Tal interacción con la célula T es el otro estímulo necesario para desencadenar la expansión clonal del linfocito B, ya que la célula T fijada libera al medio citoquinas que inducen la proliferación del linfocito B y su diferenciación para convertirse en células plasmáticas y de memoria.

La interacción específica se realiza entre el complejo CMH clase II-antígeno en la superficie del linfocito B y el receptor de T_H (TCR). Las moléculas CD3 y CD4 asociadas al receptor, así como las proteínas del CMH de las células presentadoras, están comprometidas en la transmisión de señales al interior de las respectivas células. Los dominios citoplasmáticos de las subunidades γ, δ, ε y ζ del complejo CD3 y una tirosina quinasa asociada a CD4 inician una cascada de fosforilaciones que determinan finalmente activación de factores de transcripción; se sintetizan y liberan citoquinas. También es activada la fosfolipasa C, con formación de los segundos mensajeros inositoltrisfosfato y diacilglicerol.

El estímulo es reforzado por la presencia de otras moléculas de superficie en ambas células, entre ellas moléculas de adhesión (ICAM), CD40 y CD80 en linfocitos B y LFA, CD40L (ligando de CD40) y CD28 en linfocitos T_H.

La activación de linfocitos T y B obedece a mecanismos básicos comunes; en ambos hay una señal específica a través del receptor cuando éste reconoce al antígeno y otras señales inespecíficas inducidas por las moléculas coestimulatorias. Ambas señales son responsables de la liberación de agentes activadores por las células presentadoras o los linfocitos T auxiliares.

Acción lítica de linfocitos T_C. Las células T_C utilizan una variedad de recursos para destruir sus "blancos". Estos incluyen acciones directas de célula a célula e indirectas a través de sistemas de transmisión de señales y liberación de citoquinas.

Un linfocito citotóxico activado por su unión a una célula portadora del complejo HLA clase I-Ag libera gránulos que ejercen acción lítica. Los gránulos contienen una proteína de 70 kDa llamada *perforina*, que se inserta en la membrana y se polimeriza para formar tubos o poros de unos 10 nm de diámetro, similares a los descriptos para el componente C9 del sistema complemento (fig. 30-23). Estos poros permiten el libre flujo de moléculas e iones pequeños con la consiguiente tumefacción y lisis osmótica de la célula atacada.

Fig. 30-23. Esquema del poro o canal formado por subunidades de perforina en la membrana celular.

La polimerización de la perforina es dependiente de la presencia de Ca^{2+}. Las unidades de perforina liberadas también pueden ensamblarse en la fase líquida, pero el tubo así formado no tiene posibilidades de introducirse en la bicapa lipídica; la membrana sólo admite una unidad por vez, lo que representa un mecanismo de protección para las células vecinas, no asociadas directamente al linfocito T_C. La membrana adyacente a este linfocito es la única que recibe una tras otra las unidades de perforina y resulta víctima de los canales formados.

Además de perforina, los gránulos contienen *granzimas* (enzimas de gránulos) o *fragmentinas*, serina proteasas que se activan después de su secreción. Estas enzimas se introducen en la célula blanco a través de los canales formados por la perforina y degradan proteínas de importancia vital.

La acción lítica también se cumple mediante el proceso de "muerte celular programada". Moléculas de superficie del linfocito T_C actúan como ligandos de receptores Fas en la célula atacada, activan a éstos y desencadenan la cascada de reacciones característica de la *apoptosis* (pág. 703).

Activación de macrófagos. Los macrófagos que han fagocitado un patógeno son estimulados para destruir al invasor por señales enviadas desde las células T_H $CD4^+$ inflamatorias (T_H1). Cuando el macrófago se activa se producen cambios en su comportamiento: aumentan notablemente el consumo de oxígeno, la producción de óxido nítrico, la capacidad fagocitaria y citotóxica, la expresión de proteínas CMH clase II y la secreción de la potente citoquina IFNγ y otras de gran actividad biológica (IL-1, TNF, GM-CSF y M-CSF).

CITOQUINAS

En experiencias *in vitro* con linfocitos activados por antígeno se había observado la presencia en el medio de cultivo de sustancias capaces de influir el comportamiento de células del sistema inmunitario. La existencia de estos mediadores y la multiplicidad de sus acciones biológicas fueron confirmadas por numerosos estudios. Se había observado que eran producidas por linfocitos, razón por la cual se las denominó *linfoquinas*. Luego se encontraron otras secretadas por fagocitos mononucleares a las que se designó con el nombre *monoquinas*. Muchas fueron originalmente rotuladas con nombres indicativos de su acción biológica *in vitro*, por ejemplo, factor de crecimiento de células T, factor inhibidor de la migración, factor activante de células B, factor mitogénico de timocitos, factor de diferenciación de células B, etc. Las que poseían la propiedad de atraer leucocitos (quimiotaxis) a las zonas de infección fueron llamadas *quimioquinas*, nombre que aún se utiliza.

La comprobación de que, además de linfocitos y monocitos, una variedad de células epiteliales, endoteliales y de otras clases también producen este tipo de proteínas, llevó a proponer el nombre *citoquinas* para todas ellas. Muchas de las citoquinas sintetizadas por leucocitos, macrófagos o células T actúan sobre otros leucocitos, lo que indujo a llamarlas también *interleuquinas* (IL). A medida que se caraterizan nuevas citoquinas se las designa con las siglas IL seguidas de un número (IL-1, IL-2,...,IL-27); esto permite estandarizar la nomenclatura. Los nombres citoquinas e interleuquinas tienen amplio uso en la actualidad; sin embargo, para algunas citoquinas se siguen utilizando nombres relacionados con su acción principal; se mencionarán como ejemplo el *factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos* (GM-CSF), y el *factor de necrosis tumoral* (TNF) (se utilizan las siglas del nombre en inglés).

Se han descrito más de 100 citoquinas; la gran mayoría son glicoproteínas de entre 10 y 80 kDa. Se han clonado los genes que controlan su síntesis, abriendo así el camino para su producción en cantidad mediante técnicas de ADN recombinante. El conocimiento de la estructura molecular de estos factores ha facilitado su purificación y el análisis de la actividad biológica de cada uno de ellos por separado.

Las citoquinas son responsables de muchas de las acciones tanto del sistema innato como del adaptativo. Son liberadas por células componentes de esos sistemas cuando se enfrentan con microorganismos u otros factores inmunogénicos.

Propiedades generales. Las citoquinas median y regulan las reacciones inmunes e inflamatorias. Su acción es generalmente local, autocrina o paracrina; sólo cuando se producen en gran cantidad pueden pasar a la circulación y actuar a distancia (acción endocrina), en cuyo caso determinan efectos sistémicos.

Las mismas citoquinas son producidas por diversos tipos celulares y, a su vez, una determinada citoquina es capaz de actuar sobre distintas células.

Todas ejercen sus efectos fijándose a receptores específicos en la membrana de las células "blanco" y activan sistemas de transducción de señales. Las respuestas a la mayoría de citoquinas son modificaciones de la expresión génica que resultan en cambios funcionales y a veces

en proliferación celular. Entre estos cambios se cuentan la diferenciación de linfocitos B y T.

Las quimioquinas representan una gran familia de citoquinas con alrededor de 50 miembros, cuya función es atraer y "reclutar" leucocitos en el sitio de infección, favorecer su adhesión a las paredes vasculares y su migración desde la sangre hacia los espacios intersticiales.

Receptores. Se clasifican según su estructura y el sistema de transducción utilizado. La mayoría están constituidas por dos o más subunidades. Ponen en funcionamiento distintas vías de transmisión de señales, como Jak-STAT (pág. 500), TLR/IL-1 (*toll* like/IL-1), TRAF (de *TNF receptor associated factor*), se activan cascadas de fosforilación que finalmente regulan la transcripción de genes específicos. Las quimioquinas utilizan receptores de siete pasos transmembrana, asociados a proteínas G.

Funciones. Las citoquinas cumplen funciones críticas en la defensa contra agentes patógenos. Estimulan el crecimiento y diferenciación de linfocitos, regulan la magnitud de las respuestas inmunes y aumentan su eficiencia; contribuyen a una interacción coordinada de los sistemas innato y adaptativo.

Si bien algunas citoquinas actúan en ambos sistemas, otras son predominantemente mediadoras en uno de ellos.

Las de *inmunidad innata* son sintetizadas principalmente por fagocitos mononucleares en respuesta a agentes infecciosos. Las células NK (*natural killer*) también producen citoquinas.

Esas células poseen receptores TLR (*toll-like)* que se unen, por ejemplo, a lipopolisacáridos de la pared de bacterias Gram negativas o a ARN viral de doble hebra y activan sistemas de señales que determinan producción y secreción de citoquinas, la mayoría de las cuales estimula la reacción inflamatoria y la actividad antimicrobiana. Algunas de ellas, como el factor de necrosis tumoral (TNF), interleuquinas 1, 12 y 18 (IL-1, IL-12 e IL-18) promueven la producción de IFN-γ, de acción antiviral. IL-23 e IL-27 regulan la respuesta inflamatoria, IL-10 es inhibidora de macrófagos.

Las citoquinas del *sistema inmunitario adaptativo* se generan principalmente en linfocitos T en respuesta al reconocimiento específico de antígenos. Los mediadores más importantes son las interleuquinas 2, 3, 4, 5 (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5), el interferón γ (IFN-γ) y otros. Regulan el crecimiento, diferenciación y activación de varias poblaciones de linfocitos. Las IL-12, IL-18, IL-23 e IL-27, regulan la respuesta inmune adaptativa que sigue a la innata.

Otras funciones de citoquinas. Además de cumplir un papel esencial en el sistema inmunitario, las citoquinas ejercen otras funciones muy importantes. Algunas se comportan como factores de crecimiento, otras actúan como factores de maduración y producción regulada de células sanguíneas. IL-3 y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) son activadores de la hematopoyesis de amplia especificidad; influyen sobre células pluripotentes de la médula ósea y promueven la diferenciación y proliferación de células hemáticas. Otras, como factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) e IL-5 (factor de proliferación de eosinófilos) actúan más específicamente sobre determinadas líneas celulares en etapas más tardías de su diferenciación. TNF y linfotoxina (LT) tienen intensa acción citotóxica sobre algunos tumores malignos.

En casos de producción excesiva de citoquinas, éstas pueden pasar a la sangre y provocar efectos patológicos como fiebre, estímulo de la producción en hígado de proteínas de fase aguda de respuesta a inflamaciones, trombosis, alteraciones metabólicas, disminución de la glucemia, reducción de la contractilidad del miocardio. Una complicación grave de infecciones serias es el shock séptico.

Interferón

Las células atacadas por virus sintetizan y secretan glicoproteínas de pequeña masa molecular (alrededor de 18 kDa), de la familia de las citoquinas, llamadas *interferones* (IFN). Se han aislado varias clases de estas proteínas, tipos I y II).

Interferones tipo I. Actúan como mediadores de la respuesta inicial del sistema innato a las infecciones virales. En humanos se han descrito varios, designados con letras griegas: los IFN-α (se han identificado trece), IFN-β, IFN-ε, IFN-κ e IFN-ω. Alfa y beta son los más comunes del tipo I. IFN-α es sintetizado principalmente por células dendríticas; IFN-β, por diversas células, entre ellas fibroblastos.

El estímulo más potente de la síntesis y liberación de estas citoquinas son los ácidos nucleicos virales (ARN de hebra doble o simple, ADN no metilado).

Cuando los IFN se unen a sus receptores, éstos se asocian a tirosina quinasas TyK2 y Janus (Jak) que atraen proteínas STAT 1 y 2 y las activan por fosforilación. Las STAT activadas pasan al núcleo, donde se unen a elementos de respues-

ta en el ADN, e inducen la transcripción y traducción de genes que codifican diversas proteínas (pág. 500).

La principal función de los IFN tipo I es la de contrarrestar las infecciones virales. Esto se cumple gracias a varias acciones: a) Promueven la respuesta inmune mediada por células afectadas por microorganismos intracelulares. b) Inhiben la replicación del virus induciendo la expresión de proteínas que bloquean la transcripción y traducción de ARN o ADN virales y de enzimas que degradan esos ácidos nucleicos. c) Estimulan la expresión de CMH clase I y el desarrollo de células T auxiliares. d) Favorecen el reclutamiento de linfocitos en nódulos linfáticos y su activación.

La acción es principalmente paracrina; la célula infectada segrega IFN que protege células vecinas no infectadas. Aunque también pueden tener acción autocrina, los interferones son más efectivos en prevenir la infección viral en las células no atacadas que en detenerla en las células ya invadidas.

Interferones tipo II. Se reconoce como perteneciente a esta clase al IFN-γ. Es segregado por células T auxiliares y NK; activa macrófagos, incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno y de óxido nítrico, lo que aumenta su capacidad microbicida.

En linfocitos B modula el cambio de isotipo, aumenta la producción de IgG y reduce la de IgE. Las IgG activan el complemento y, como consecuencia, estimulan la fagocitosis de microbios opsonizados. Otra función del IFN-γ es inducir la expresión de proteínas de los CMH clases I y II.

En suma, el papel principal de IFN-γ es promover las reacciones inflamatorias de macrófagos e inhibir la reacción de eosinófilos dependientes de IgE.

Si bien los interferones son inespecíficos para el virus, son específicos de especie, es decir, sólo son activos en individuos de la misma especie que los produjo.

Además de su efecto antiviral, el interferón posee otras actividades biológicas, como inhibición de la proliferación celular. Esta acción despertó interés por su posible aplicación en el tratamiento de tumores.

Hasta hace poco, la utilización de interferón con fines terapéuticos estuvo muy limitada por la imposibilidad de obtenerlo en cantidades adecuadas. Actualmente las técnicas de ingeniería genética permiten su producción a escala industrial y su utilización con fines terapéuticos. Se lo administra en infecciones virales y en algunas neoplasias.

Patología relacionada con el sistema inmunitario

La defensa eficaz contra los agentes infecciosos requiere del funcionamiento normal de los sistemas inmunitarios, tanto innato como adaptativo. Fallas en los componentes de estos sistemas (linfocitos, fagocitos, vías de transducción de señales, factores mediadores, etc.) producen trastornos serios, a veces letales.

En general, a estas fallas se las denomina *inmunodeficiencias*, que pueden ser congénitas (primarias) o adquiridas (secundarias). Todas ellas se acompañan de susceptibilidad exagerada a infecciones. Su gravedad depende de cuál sea el componente afectado y la magnitud de la alteración.

Inmunodeficiencias congénitas. *Del sistema innato*. Existen defectos que reducen la eficacia de los fagocitos inespecíficos, ya sea por disminución de la capacidad de producir especies reactivas de oxígeno, o de la función lisosomal, por anomalías en los receptores TL (*toll-like*), o de los mediadores de adhesión y migración de leucocitos, o fallas en la vía alternativa del complemento. Todas las anomalías mencionadas comprometen el accionar del sistema innato como primera línea de defensa.

Del sistema adaptativo. Las inmunodeficiencias congénitas pueden afectar a linfocitos B, a linfocitos T o a ambos.

Inmunidad humoral. Existe un grupo de enfermedades rotuladas como *inmunodeficiencias comunes variables* que comprende alteraciones de linfocitos B, con incapacidad para responder a un antígeno y producir anticuerpos o defectos en la interacción de células B con linfocitos T.

Las anormalidades en el desarrollo o activación de linfocitos B trastornan principalmente la síntesis de anticuerpos. Puede producirse disminución de inmunoglobulinas (hipogamaglobulinemia), falta total (agamaglobulinemia) e incluso hipergamaglobulinemias.

Entre las hipogamaglobulinemias, la más frecuente es la deficiencia selectiva de IgA. Los pacientes padecen infecciones recurrentes de vías respiratorias y genitourinarias debidas a la falta de IgA secretoria en las mucosas. Aunque más raramente, se dan también casos de deficiencias selectivas de otras inmunoglobulinas (como IgG_2 e IgG_4) o las que comprometen a varios de los tipos de Ig.

De las agamaglobulinemias hay una forma ligada al cromosoma X y otras de herencia autosómica recesiva. Suelen acompañarse de reducción del número de linfocitos B circulantes.

Se ha descrito hipergamaglobulinemia IgM ligada al cromosoma X. Además del aumento de IgM se encuentran niveles bajos de IgG, IgA e IgE; la falla comúnmente radica en el mecanismo de cambio de isotipo (*switching*).

Las inmunodeficiencias que afectan a linfocitos B disminuyen principalmente la resistencia a las infecciones producidas por bacterias piogénicas (productoras de pus). Los pacientes son proclives a padecer otitis, neumonía, meningitis, osteomielitis. También sufren infecciones recurrentes por bacterias entéricas o por algunos parásitos.

Los niños normales de 2 a 5 meses de edad presentan *hipogamaglobulinemia* que puede considerarse fisiológica. El recién nacido posee inmunoglobulinas transferidas desde la sangre materna por vía placentaria. El nivel de estas Ig en plasma disminuye progresivamente a partir del nacimiento hasta llegar a valores mínimos a los 3 meses de vida. La deficiencia afecta principalmente a las IgG. La concentración de Ig se restablece en los meses siguientes, a medida que el niño adquiere capacidad para sintetizar sus propios anticuerpos. En prematuros, esta hipogamaglobulinemia transitoria es mucho más prolongada.

Inmunidad celular. Los defectos en la activación de linfocitos T se manifiestan por alteraciones de las respuestas inmunes dependientes de esas células; algunas producidas por mutaciones en los genes que codifican receptores de células T. También alteran el funcionamiento del sistema de inmunidad celular las fallas en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad.

Los cuadros que afectan a ambos sistemas, celular y humoral, son denominados *inmunodeficiencias combinadas severas*. Algunas se deben a anormalidades en la producción de citoquinas o de las vías de transducción que responden a ellas (por ejemplo, mutaciones en los receptores), a alteraciones en el desarrollo del timo, etc. La disfunción de los linfocitos T puede extenderse a células B y NK.

Alrededor del 50% de las inmunodeficiencias combinadas severas tienen un patrón de herencia autosómica recesiva; de éstas muchas se deben a falta de adenina desaminasa; en estos casos se produce aumento de desoxiadenosina y dATP, especialmente en linfocitos T. La acumulación de esos compuestos tiene efectos tóxicos que causan destrucción celular y hasta bloqueo de la síntesis de ADN. Es una condición letal que lleva, a edad temprana, a la muerte por infecciones. El transplante de médula ósea, de células madre u otras formas de terapia génica ofrecen esperanzas de curación.

Inmunodeficiencias adquiridas. La malnutrición calórico-proteica grave compromete la síntesis de proteínas en general y, por supuesto, la de anticuerpos y otras moléculas implicadas en los sistemas inmunitarios. Especialmente los niños con desnutriciones severas son presa fácil de todo tipo de infecciones. Los tumores malignos, especialmente los que producen metástasis en médula ósea, y las leucemias, se acompañan de inmunodeficiencia. Esta también se observa en los tratamientos de inmunosupresión utilizados en pacientes con transplante de órganos o en enfermedades autoinmunes.

La infección por ciertos virus es causa de alteraciones del sistema inmune. A este respecto, ha adquirido alarmante difusión el *síndrome de inmunodeficiencia adquirida* (sida), producido por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) que se transmite por vía sexual, sanguínea y transplacentaria. La acción del virus determina reducción de linfocitos T auxiliares y alteraciones de macrófagos, que inhabilitan al individuo para responder adecuadamente a distintas infecciones y lo hacen susceptible al desarrollo de tumores malignos.

Enfermedades autoinmunes. A lo largo de este capítulo se ha señalado que los mecanismos del sistema inmune se ponen en juego para eliminar agentes invasores extraños al organismo. Los receptores T y anticuerpos discriminan con notable precisión entre lo propio y lo "foráneo".

Sin embargo, hay condiciones patológicas en las cuales el sistema se "rebela" y ataca células del propio individuo. Esta anomalía produce las *enfermedades autoinmunes*.

Normalmente existen mecanismos que protegen contra el desarrollo de leucocitos autorreactivos. Son los llamados procesos de *tolerancia*. La *tolerancia central* se ejerce en la médula ósea y en el timo, donde se eliminan, antes de su maduración, a las células B y T portadoras de receptores que reconozcan autoantígenos. Eventualmente escapan hacia la circulación leucocitos autorreactivos, que son desactivados en los órganos linfoideos periféricos (*tolerancia periférica*).

Cuando los procesos de tolerancia fallan, se producen células B o T activadas capaces de generar reacciones autoinmunes y dañar tejidos propios. En algunos casos la lesión es producida por anticuerpos, en otros, por linfocitos T.

Entre las enfermedades autoinmunes causadas por anticuerpos se mencionarán la *miastenia gravis*, los anticuerpos atacan los receptores de acetilcolina; la *-púrpura trombocitopénica*, son afectadas proteínas de membrana de plaquetas;

la *enfermedad de Graves*, los anticuerpos que se unen a receptores de hormona tiroestimulante y los activan con producción de hipertiroidismo; la *anemia perniciosa*, en la cual es anulado el factor intrínseco de células parietales del estómago, lo que impide la absorción de la vitamina B_{12}.

A veces se forman en cantidad complejos anticuerpo-autoantígeno que se depositan en paredes de arteriolas, activan el complemento y promueven la iniciación de procesos inflamatorios que dañan los vasos y tejidos adyacentes. Ejemplo: el *lupus eritematoso*, con daños sistémicos o generalizados producidos por anticuerpos contra ADN, proteínas nucleares, glomérulos renales, membranas de eritrocitos, u otros autoantígenos.

Son producidas principalmente por células T la *diabetes mellitus tipo I* (insulino dependiente) en la cual son dañadas las células β de los islotes de Langerhans del páncreas; la *esclerosis múltiple*, ataca proteínas de mielina; algunos casos de *artritis reumatoidea*, en la que el "blanco" de los autoanticuerpos son proteínas sinoviales de articulaciones.

Las enfermedades autoinmunes no tienen herencia mendeliana simple; en su mayoría son poligénicas, lo que determina, en algunos individuos, predisposición a padecerlas. Entre los genes asociados a varias de estas enfermedades, los más importantes son los del complejo mayor de histocompatibilidad clase II.

Infecciones a virus o bacterias a veces contribuyen al desarrollo o agravación de la autoinmunidad. Algunas promueven aumento de factores coestimulantes de la reacción inmune, otras introducen moléculas que mimetizan las del propio individuo y producen reacciones cruzadas.

RESUMEN

El sistema inmunitario tiene activa participación en la defensa del organismo contra la invasión de agentes extraños.

Sistema innato. Se opone a la invasión de agentes patógenos, no requiere de "experiencia" previa. Piel y mucosas constituyen una primera barrera. Luego células fagocitarias provistas de receptores TLR (*toll-like receptor*) reconocen ciertas moléculas de microorganismos, como lipopolisacáridos, lipopéptidos, ARN de doble hélice, etc., e inician un proceso inflamatorio o promueven liberación de interferón.

Sistema adaptativo. Integrado por células presentes en órganos linfoideos y en sangre circulante, entre las que se destacan los linfocitos B y T. Los linfocitos B están vinculados a la producción de inmunoglobulinas (Ig) o anticuerpos (inmunidad humoral); los linfocitos T son efectores de la inmunidad mediada por células (inmunidad celular).

Se denominan antígenos (Ag) los agentes (microorganismos, partículas, células o moléculas) que, al penetrar en el organismo, provocan una respuesta inmunitaria. Sólo porciones pequeñas del antígeno (determinantes antigénicos o epitopos), reconocidas como extrañas por el sistema inmunitario, son las responsables de la reacción inmune.

Inmunidad humoral. Como respuesta a un antígeno, un linfocito B se multiplica y diferencia en células plasmáticas, todas las cuales producen Ig idénticas (selección clonal).

Inmunoglobulinas. Están constituidas por unidades estructurales formadas por cuatro cadenas polipeptídicas unidas entre sí por puentes disulfuro. Dos de ellas son cadenas pesadas o H (50 kDa, 440 aminoácidos) y las otras dos, cadenas livianas o L (25 kDa, 220 aminoácidos). Los primeros 110 restos aminoacídicos de ambas cadenas constituyen los dominios variables (V_H y V_L). Dentro de éstos existen al menos tres segmentos hipervariables en los cuales se presentan las mayores diferencias en secuencia de aminoácidos entre distintas Ig; se los denomina regiones determinantes de complementariedad (CDR). Cada zona V_H se enfrenta a una V_L y entre ambas forman un nicho donde puede alojarse el epitopo. La unión anticuerpo-antígeno es similar a la de enzima-sustrato (adaptación inducida). La conformación del sitio de unión da especificidad a la Ig y le permite reconocer un determinado Ag. Cada unidad estructural tiene dos sitios de fijación de Ag. Desde la terminación de la zona variable hasta el extremo C-terminal de cada cadena se extiende la región constante (C_H y C_L). Las cadenas L poseen un dominio constante (C_L) y las H tres a cuatro según el tipo de cadena pesada. En algunas Ig, entre los dominios C_{H1} y C_{H2} se extiende la región bisagra. A la zona C_{H2} se unen hidratos de carbono. Si se tratan Ig con papaína, se separan tres fragmentos, dos Fab y uno Fc. Los fragmentos Fab poseen cada uno un sitio de unión de antígeno. En la porción Fc se encuentran sitios de funciones generales de las Ig. Existen cinco clases de Ig que difieren entre sí por el tipo (isotipo) de cadena pesada que presentan. La IgG tiene cadenas γ; la IgA, α; la IgM, μ; la IgD, δ, y la IgE, ε. Las cadenas livianas pueden ser de cualquiera de dos tipos, κ o λ. Las IgG, IgD e IgE son monómeros de una unidad estructural; las IgM son pentámeros y las IgA se presentan como dímeros. Los linfocitos B tienen IgM e IgD insertas en su membrana, en la cual actúan como receptores sobre los cuales se fija el Ag.

Naturaleza del antígeno. En general, los Ag son macromoléculas. Los más comunes son proteínas y heteropolisacáridos. Los lípidos y los ácidos nucleicos tienen escasa capacidad antigénica, que aumenta si se unen a proteínas. Algunas moléculas pequeñas (haptenos) actúan como Ag cuando se las asocia a proteínas.

El determinante antigénico o epitopo de una proteína comprende de 12 a 20 restos aminoacídicos que convergen en una zona reducida de la superficie molecular gracias a la estructura terciaria. Una proteína desnaturalizada generalmente no es reconocida por un anticuerpo específico para la molécula nativa.

Diversidad de anticuerpos. Un individuo es capaz de sintetizar más de 10^7 Ig de especificidad diferente. El control de la síntesis de tan enorme número de proteínas está a cargo de genes agrupados en tres *loci*, uno para cadenas H, otro para L_κ y otro para L_λ. En células germinales, los genes de cadena H están dispuestos en tres conjuntos para región variable: V (51 genes), D (25 genes) y J (6 genes); a continuación sigue un gen para cada uno de los isotipos de región constante. Los genes de cadenas L_κ tienen dos grupos para la región variable, V (40 genes) y J (5 genes) y un gen para la región constante. Los genes de cadena L_λ poseen genes V (unos 31) y J (4) de zona variable y 6 genes para la constante.

Durante la maduración del linfocito B se produce reordenamiento de los genes de Ig, que comienza con los genes de zona variable de cadenas H. Se selecciona al azar uno de los genes en cada grupo y se los une para formar un bloque continuo VDJ que codificará para la región variable (configuración reordenada). Hay no menos de 7.650 posibilidades de formar combinaciones V-D-J diferentes para cadenas H. Luego se reordenan los genes de zona variable de cadena L_κ. Se produce un bloque VJ a partir de cualquiera de los genes V y cualquiera de los J. Si no se logra un reordenamiento viable para cadena L_λ se procede al ensamble de un bloque VJ para L_λ. Es posible formar unas 324 combinaciones VJ distintas, sumadas las cadenas κ y λ. El ensamble de los genes V-D-J o V-J exige el corte y eliminación de todo el ADN intermedio que originalmente separaba a los genes elegidos. El reordenamiento se hace sólo en uno de los alelos del *locus* (*exclusión alélica*) para asegurar la síntesis de Ig monoespecíficas en cada linfocito B. La variedad de Ig producidas es aún mayor a causa de la existencia de imprecisiones en el empalme de genes y por la adición de bases al extremo 3' de los segmentos que se unen. La síntesis de Ig de membrana o Ig secretadas es regulada por señales de poliadenilación. El cambio de isotipo de cadenas pesadas requiere un nuevo reordenamiento del ADN en la región de genes de zona constante. Secuencias previas a cada gen C dirigen el cambio. La intensa actividad de síntesis de Ig es regulada por secuencias aumentadoras (*enhancers*). En los bloques VDJ y VJ de ADN reordenado en células de memoria, hay una alta incidencia de mutaciones puntuales (hipermutación somática), que permite obtener Ig de mayor afinidad por el Ag y mejorar respuestas ulteriores.

Anticuerpos monoclonales. Son los sintetizados por células plasmáticas de un mismo clon; todos tienen idéntica especificidad de Ag.

Complemento. *Vía clásica.* Es activada por complejos antígeno-anticuerpo. Todos sus componentes son glicoproteínas. C1 está formado por tres proteínas, Clq, Clr y Cls. Las dos últimas son zimógenos. C1 se fija a la porción Fc de complejos Ag-Ig y ello produce activación de Clr, la cual inicia una serie de reacciones proteolíticas en cascada. Clr cataliza la hidrólisis de Cls y la convierte en proteasa activa. C1s cataliza la separación de C4 en dos trozos, C4a y C4b. C4b se une a superficies próximas y a C2. C1s promueve la hidrólisis de C2, separándola en C2a y C2b. C2a es una proteasa; unida a C4b forma el complejo C4bC2a o C3 convertasa. C4bC2a divide a C3 en dos fragmentos C3a y C3b. C3b forma el complejo C4bC2aC3b o C5 convertasa. C4bC2aC3b cataliza la hidrólisis de C5 en C5a y C5b. Este último inicia la formación del complejo de ataque de membrana o lítico, uniéndose sucesivamente a C6, C7 y C8. El complejo C5bC6C7C8 se fija a la membrana y promueve la polimerización de unidades C9 que forman poros o canales a través de la bicapa lipídica. El complejo de ataque lítico $C5bC6C7C8(C9)_n$ es responsable de la destrucción de células o microorganismos.

Vía alternativa. Es activada por macromoléculas de superficie de microorganismos. C3b formado en el plasma puede escapar a la inactivación si se fija a lipopolisacáridos. El factor D del plasma produce hidrólisis del factor B y lo convierte en Ba y Bb. Bb es una proteasa que se une a C3b y forma el complejo C3bBb o C3 convertasa, el cual produce más C3b a partir de C3. Luego se une a properdina para dar C3bBbP o C5 convertasa, que actúa sobre C5 y lo desdobla en C5a y C5b. C5b inicia la formación del complejo de ataque lítico.

Además de su acción lítica, el sistema complemento tiene otras funciones: a) impide la formación de acúmulos de complejos antígeno-anticuerpo; b) los fragmentos C3b y C4b se fijan a la superficie de partículas o células (opsonización), facilitando su adherencia a macrófagos y su posterior fagocitosis; c) los fragmentos C3a, C4a y C5a son *anafilatoxinas*; actúan sobre células cebadas, basófilos, plaquetas y células de músculo liso promoviendo la liberación de mediadores químicos de la inflamación y contracción del músculo liso. C5a tiene también acción quimiotáctica.

Inmunidad celular. Los efectores son linfocitos T de varios tipos: células T auxiliares (T_H), citotóxicas (T_C) y supresoras (T_S). Las células T_H poseen en la membrana proteínas CD4 (linfocitos T_H $CD4^+$ o T4); las células T_C, proteínas CD8 (linfocitos T_C $CD8^+$ o T8).

Receptores T. Todas las células T están dotadas de receptores formados por dos cadenas polipeptídicas (α y β) unidas por puentes disulfuro. α y β tienen dos dominios cada una, el primero variable (V) y el segundo constante (C), y un trozo que atraviesa la membrana. Los dominios V y C poseen un enlace -S-S- intracatenario. Ambas regiones V forman el sitio de unión del Ag y son responsables de la especificidad del receptor. Existe una enorme diversidad de receptores, cuya síntesis es controlada por genes que sufren reordenamientos similares a los de genes de Ig. El receptor de células T está constituido por dos heterodímeros αβ, responsables de su especificidad, de correceptores (CD4 o CD8) y del complejo CD3, agrupación de seis polipéptidos: γ, δ, dos ε y dos ζ, encargados de transmitir señales al interior de la célula. Los receptores T reconocen Ag sólo si están unidos a proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH o también HLA en humanos) en la superficie de células accesorias. Existen dos clases de proteínas del CMH: I y II.

Proteínas del CMH clase I. Formadas por una cadena α, inserta en la membrana, y una β_2-microglobulina. La cadena α posee tres dominios (α_1, α_2 y α_3) y un segmento transmembrana. La β_2-microglobulina sólo tiene un dominio. Los dominios α_2 y α_3 y la β_2-microglobulina presentan un enlace S–S intracatenario. CMH clase I se expresan en todas las células excepto eritrocitos y sincicio trofoblasto. Existen tres subclases (A, B y C) que presentan gran polimorfismo genético en la población humana. La mayoría de las personas son heterocigotas en los tres *loci* de CMH clase I y expresan seis proteínas diferentes.

Proteínas del CMH clase II. Están formadas por dos cadenas (α y β). Ambas tienen dos dominios y una porción transmembrana. CMH clase II se expresan sólo en las células presentadoras de antígeno (macrófagos, monocitos, linfocitos B, células dendríticas). Existen tres subclases (DR, DQ, DP) que presentan gran variabilidad genética.

Las células T detectan la presencia de proteínas del CMH distintas de las propias y pueden iniciar una respuesta inmunitaria tendiente a eliminar las células extrañas que las poseen. Ello es causa del rechazo de injertos de órganos no compatibles.

Las proteínas del CMH cumplen la misión de presentar el Ag al receptor de células T; sirven como moléculas guía para el reconocimiento. Los receptores T sólo detectan Ag si son presentados en asociación con proteínas del CMH del propio individuo (restricción por CMH). Los receptores de células T_H reconocen Ag unidos a proteínas del CMH clase II y los receptores T_C Ag fijados a CMH clase I.

Antes de asociarse a proteínas del CMH, el Ag es procesado por la célula presentadora. Proteínas procedentes del medio externo siguen la *vía exógena:* el antígeno es internado por endocitosis, degradado a péptidos pequeños en endosomas-lisosomas, donde se unen a proteínas del CMH-II. El complejo CMH-II-Ag es expuesto en la membrana plasmática. La *vía endógena* procesa proteínas sintetizadas en células del propio individuo, ya sean proteínas virales producidas por células infectadas por virus o proteínas anormales elaboradas por células tumorales. Estas proteínas penetran en proteasomas, son hidrolizadas en péptidos pequeños, transportadas a las cisternas del retículo endoplásmico donde se fijan a proteínas CMH clase I. El complejo CMH-I pasa al Golgi y luego a la superficie de la célula presentadora.

La acción lítica de células T_C sobre las células en las cuales reconocen un Ag unido a CMH clase I se ejerce mediante la secreción de *perforina*, proteína que polimeriza formando canales o poros transmembrana en la célula atacada, semejantes a los del complejo de ataque lítico del complemento. Además se secretan proteasas llamadas *granzimas*. También puede inducirse apoptosis.

Citoquinas. Son proteínas secretadas por células del sistema inmunitario, con acción paracrina o autocrina. También se utiliza el nombre interleuquina (IL) para este tipo de sustancias.

Los linfocitos T se activan por un doble estímulo: uno específico, producido por la unión del Ag asociado a proteínas del CMH, y otro inespecífico, inducido por mediadores químicos (citoquinas). Las células T_H $CD4^+$ se unen a antígenos fijados a CMH clase II en la superficie de células presentadoras, las cuales, así como los linfocitos T_H activados secretan diversas citoquinas, inducen la expresión de receptores IL-2 y activan la expansión clonal de linfocitos T. Las células T_H colaboran en la activación de linfocitos B. Cuando una célula B fija un Ag a su Ig_m lo interna, lo degrada y une los péptidos resultantes a CMH clase II para exponerlos en su superficie. Una célula T_H $CD4^+$ se une al complejo Ag-CMH clase II y secreta citoquinas que estimulan la proliferación y diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas y de memoria.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. (2007). *Cellular and Molecular Immunology*, 6ta. Ed., Saunders Elsevier, Filadelfia.

Beutler B. (2004). Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*, 430: 257-263.

Infection and Immunity. (2004). Serie de Artículos. *Nature*, 430: 241-271.

Kindt T.J., Goldsby R.A., Osborne B.A. (2007). *Inmunología*, 6ta. Ed., McGraw Hill, México.

Murphy K.M., Travers P., Walfort M. (2007). Janeway's *Immunobiology: The immune system in health and disease*, 7ma. Ed., Garland Publishing, Londres.

CAPÍTULO 31

Hemostasis

Cuando una lesión afecta la integridad de las paredes vasculares se ponen en marcha mecanismos tendientes a limitar la pérdida de sangre. Esos mecanismos, llamados de hemostasia, comprenden vasoconstricción local, depósito de plaquetas y coagulación de la sangre, que procura taponar con una masa gelatinosa (coágulo) el área dañada.

Deposición de plaquetas. Inmediatamente después de producida la ruptura en un vaso sanguíneo, o una lesión en el endotelio, las plaquetas se adhieren al colágeno subendotelial. La unión se establece entre una proteína de adhesión o integrina expresada por las plaquetas, la *glicoproteína Ib* (GpIb), que interactúa con el *factor von Willebrand* (vWf), proteína multimérica sintetizada por las células endoteliales y secretada al subendotelio, donde se une al colágeno. Una vez fijadas por la unión GpIb-vWF, las plaquetas se activan y liberan su contenido de gránulos de depósito (serotonina, ADP); éstos promueven la adhesión y activación de plaquetas vecinas, que van formando un tapón. Si la agregación de plaquetas no es controlada, sigue propagándose y puede ocluir totalmente el vaso. Esto no ocurre normalmente gracias a agentes antiagregantes, como prostaciclina (prostaglandina I_2), óxido nítrico (ex factor de relajación vascular derivado de endotelio) y ADPasa, liberados por células endoteliales. La agregación de plaquetas es inhibida también por diversos fármacos, entre ellos el ácido acetilsalicílico (aspirina).

COAGULACIÓN DE LA SANGRE

La coagulación de la sangre implica una serie de reacciones enzimáticas en cascada, en la cual intervienen más de doce proteínas, fosfolípidos de membranas celulares y Ca^{2+} (tabla 31-1). La existencia de varios de esos factores fue inferida a partir de observaciones clínicas en pacientes con trastornos de la coagulación debidos a defectos genéticos.

La mayoría de los participantes en este proceso se identifican con números romanos, asignados según el orden de descubrimiento. Los factores activados se denotan agregando la letra *a*.

La formación del coágulo se debe a la conversión del *fibrinógeno* (factor I), proteína soluble del plasma sanguíneo, en un polímero insoluble, la *fibrina*, que forma una red y atrapa las células de la sangre. La transformación de fibrinógeno en fibrina es la última etapa de una cascada de reacciones proteolíticas, representadas en el esquema de la figura 31-1. Los factores iniciadores del proceso se encuentran en el plasma en muy bajas concentraciones; sin embargo, la capacidad de amplificación del mecanismo en cascada asegura una respuesta eficiente.

Siete de los factores de coagulación, a saber, precalicreína, protrombina (II), proconvertina (VII), factor Christmas (IX), factor Stuart-Prower (X), tromboplastina plasmática (XI) y factor Hageman (XII) son zimógenos que se convierten en proteasas por hidrólisis selectiva de una o más uniones peptídicas de sus moléculas. Las enzimas activas son serina proteasas pertenecientes a la familia que incluye, entre otras, a la tripsina, la quimotripsina y la elastasa del jugo pancreático. Todas tienen un resto serina esencial en el sitio activo.

Los factores II, VII, IX y X son proteínas sintetizadas en hígado, caracterizadas por poseer restos γ-carboxiglutamato (dominio Gla) en la

porción inicial de sus moléculas. Los restos γ-carboxiglutamato son buenos quelantes de Ca^{2+} y favorecen la fijación a fosfolípidos de las proteínas que los poseen. La formación de residuos Gla por carboxilación postraducción de residuos glutamato requiere vitamina K como cofactor. En la avitaminosis K hay trastornos de la coagulación porque los factores II, VII, IX y X no se carboxilan y por lo tanto son inoperantes.

El factor XIII es un zimógeno que al ser activado se transforma en transamidasa (transglutaminasa o factor XIIIa).

Etapas de la coagulación de la sangre

La conversión de fibrinógeno en fibrina, etapa final del proceso, es catalizada por una proteasa llamada *trombina* (factor IIa), formada a partir de un precursor inactivo, *protrombina* (factor II), por acción de otra enzima proteolítica, el factor Xa. Dos vías diferentes, *intrínseca* y *extrínseca* convergen en la producción de Xa. La vía intrínseca recibe este nombre porque todos los factores que en ella participan se encuentran en la sangre. La extrínseca, en cambio, utiliza un factor procedente de tejidos lesionados (factor tisular).

El proceso global de la coagulación puede dividirse en tres etapas: la primera termina con la formación de factor Xa, la segunda comprende la activación de trombina, y la tercera, la producción de fibrina (fig. 31-1).

Primera etapa: formación de Xa

1. **Vía intrínseca.** Se describen tres pasos:

a. *Formación de XIa.* Comienza cuando la sangre entra en contacto con una superficie "no fisiológica", es decir, distinta del endotelio vascular. En caso de lesión de la pared, la lámina basal del vaso o fibras colágenas, proveen el medio de iniciación. En general, superficies polianiónicas (electronegativas) cumplen el mismo papel. Materiales no biológicos, entre ellos vidrio y caolín, actúan como desencadenantes de las reacciones.

Los factores comprometidos son *precalicreína*, *cininógeno* de elevada masa molecular, factor Hageman (XII) y antecedente tromboplastínico del plasma (XI). A diferencia de las etapas siguientes, ésta no requiere Ca^{2+}.

Los cuatro factores mencionados se adsorben sobre la superficie. El XII, si bien es un zimógeno, tiene débil acción proteolítica y cataliza la conversión de precalicreína en calicreína. Esta serina proteasa, potenciada por cininógeno, activa el factor XII. La proteasa XIIa convierte el antecedente tromboplastínico del plasma (XI) en factor activo (XIa). Como se señala más adelante, actualmente se resta importancia a este paso inicial. La deficiencia de factor XI es la causa de *hemofilia C*, no ligada al cromosoma X. Esta condición es más leve que las otras formas comunes de hemofilia; los síntomas hemorragíparos son infrecuentes.

b. *Formación de IXa.* El factor IX (factor Christmas) se encuentra en plasma como zimógeno. En presencia de Ca^{2+} el factor XIa cataliza la hidrólisis de una unión peptídica en la molécula del factor IX y libera un glicopéptido de 10 kDa. El resto de la cadena es la proteasa activa IXa. El factor IX es una glicoproteína codificada por un gen del cromosoma X. Su deficiencia produce la *hemofilia B*, caracterizada por serios trastornos en la coagulación.

c. *Formación de Xa.* Sobre la membrana de las plaquetas se forma un complejo constituido por los factores IXa, X y VIII. Los residuos γ-carboxiglutamato de los factores IXa y X actúan como quelantes de Ca^{2+} y favorecen el anclaje de esas moléculas a fosfolípidos. Se unen primero IXa y X a la membrana de las plaquetas, y de inmediato se suma el factor VIII, que actúa como cofactor de IXa en la activación del factor X. El complejo IXa, X y VIII es llamado *tenasa intrínseca*.

El gen que codifica el factor VIII está localizado en el cromosoma sexual X. Mutaciones en este gen pueden determinar fallas en la producción de la proteína y dar un cuadro clínico conocido como *hemofilia A*. Esta es la más frecuente enfermedad genética de la coagulación. Las mujeres heterocigotas para el defecto son portadoras asintomáticas, ya que el gen normal compensa la anomalía del otro alelo. En cambio, los varones que reciben de su madre el gen anormal padecen la enfermedad pues sólo tienen el cromosoma X materno. El tratamiento de estos pacientes exige frecuentes transfusiones y administración periódica de concentrados de plasma ricos en factor VIII. Esta terapéutica tiene serios inconvenientes, entre ellos la posibilidad de infecciones virósicas como sida y hepatitis. Los hemofílicos constituyen un grupo en alto riesgo de contraer estas infecciones. El gen del factor VIII ha sido clonado y la proteína es producida por técnicas de ADN recombinante. Se ofrece así la posibilidad de administrar la proteína pura, sin los peligros de los tratamientos utilizados hasta el presente.

El factor VIII se asocia en plasma al factor von Willebrand (vWF), glicoproteína polimérica formada por subunidades de 225 kDa cada una. Esta proteína favorece la interacción del

complejo tenasa intrínseca con plaquetas. Tiene homologías estructurales con otras proteínas "adhesivas", como la fibronectina. Se han descripto cuadros de trastornos en la coagulación debidos a ausencia de vWF. Se trata de la enfermedad de von Willebrand, de carácter hereditario.

En el complejo que forman IXa, X, VIII, fosfolípidos de plaquetas y Ca^{2+}, el factor IXa puede actuar sobre el X, convirtiéndolo en la proteasa Xa.

2. **Vía extrínseca.** Cuando la sangre entra en contacto con tejidos lesionados o se mezcla con extractos tisulares, se genera rápidamente factor Xa. En este caso, la activación del zimógeno X es mediada por un complejo formado por factor VII, Ca^{2+} y factor tisular (tromboplastina o III). El factor tisular es una lipoproteína presente en los tejidos, principalmente pulmón, cerebro y placenta. Como la actividad del factor tisular se manifiesta después de producida una lesión, se supone que normalmente se encuentra en células del subendotelio.

El factor VII se activa después de su unión a la porción fosfolipídica del factor tisular por sus residuos γ-carboxiglutamato con Ca^{2+} quelado. El complejo VIIa-factor tisular-Ca^{2+}, llamado *tenasa extrínseca,* convierte el factor X en proteasa activa (Xa).

La vía extrínseca es rápida, se cumple en pocos segundos, mientras la intrínseca insume varios minutos. Ambas convergen en la formación de Xa (fig. 31-1). Las etapas siguientes son comunes a las dos vías.

Como los pacientes con deficiencias en los factores VIII o IX padecen serios cuadros hemorrágicos aun cuando la vía extrínseca funcione con entera normalidad, se consideró que esta vía era de menor importancia. Por otra parte, las deficiencias de factores de contacto de la vía intrínseca (precalicreína, cininógeno, XII) no producen trastornos, mientras la falta de factor VII es causa de hemorragias. Estas observaciones, sumadas al hallazgo de un inhibidor endógeno del factor tisular (TFPI, de *tissue factor pathway inhibitor*), indujeron a reformular la hipótesis en un modelo que integra las vías extrínseca e intrínseca.

El proceso de coagulación se inicia cuando el daño de los vasos sanguíneos expone la sangre al factor tisular (TF o III). En el plasma normal existen pequeñas cantidades de VIIa que, aislado, tiene escasa actividad. La unión de VIIa al factor tisular expuesto forma el *complejo tenasa extrínseca* (TF-VIIa), en el cual aumenta notablemente la eficiencia catalítica de VIIa; se activa el factor X, indispensable para la formación de trombina en la etapa siguiente. La tenasa extrínseca también promueve la formación de IXa, pero pronto

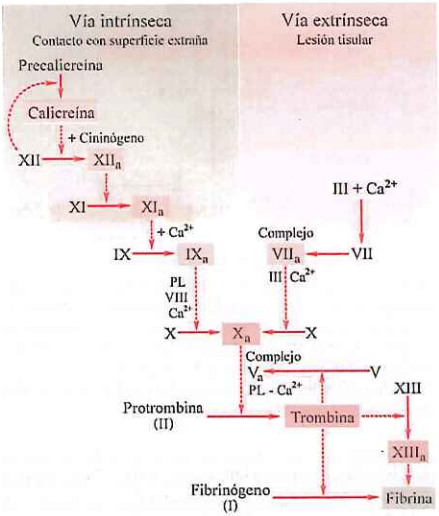
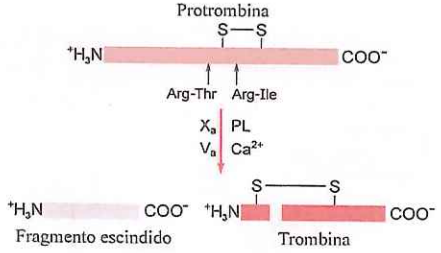


Fig. 31-1. Etapas de la coagulación de la sangre. Las flechas en trazo lleno grueso indican conversión de zimógeno en producto activo. En recuadro las enzimas activadas. Las flechas en trazo cortado señalan acción proteolítica. PL: fosfolípidos.

su acción es limitada por la presencia de TFPI, que se une a Xa y luego a TF-VIIa para dar el complejo cuaternario Xa-TFPI-TF-VIIa, sin actividad procoagulante. A pesar de esta inhibición, la cascada de reacciones no se detiene debido a la interacción del factor IXa con VIII (complejo tenasa intrínseca) que activa al factor X. Además, la formación de IXa promovida inicialmente por la tenasa extrínseca es también catalizada por α-trombina y autosostiene el proceso. En la secuencia de etapas mencionada, el primer paso de la vía intrínseca, que comprende los factores de contacto, pierde significación fisiológica.

Segunda etapa: formación de trombina

La *α-trombina* (factor IIa) es una proteasa generada por hidrólisis del zimógeno *protrombina* (factor II), glicoproteína constituida por una cadena de 582 aminoácidos con 12 puentes disulfuro. La ruptura de una unión arginina-treonina catalizada por Xa libera un fragmento de 32 kDa en el extremo N-terminal. La hidrólisis de un segundo enlace peptídico arginina-isoleucina origina otros dos segmentos, que permanecen unidos por un puente disulfuro (fig. 31-2). Esta



Fg. 31-2. Esquema de la formación de α-trombina. La molécula de protrombina es hidrolizada en dos uniones peptídicas (Arg-Thr y Arg-Ile) señaladas con flechas en la figura. La acción es catalizada por Xa, potenciada por Va del complejo protrombinasa (Ca^{2+}) formado sobre fosfolípidos (PL) de membrana. El fragmento del extremo N-terminal es separado; los otros dos segmentos se mantienen unidos por un puente disulfuro.

estructura de 36,7 kDa es la α-trombina, serina proteasa homóloga de la tripsina pero mucho más selectiva que ésta. Ataca únicamente uniones con arginina en posiciones definidas de sus sustratos.

La transformación de protrombina en α-trombina se debe a la acción hidrolítica del factor Xa potenciada por la formación de un complejo con proacelerina (factor V), fosfolípidos de membranas plaquetarias y Ca^{2+} (*complejo protrombinasa*). El factor Xa y la protrombina se unen a fosfolípidos gracias a sus restos γ-carboxiglutamato y Ca^{2+}. El factor V es activado a acelerina (Va) por α-trombina. La constitución del complejo protrombinasa favorece las interacciones moleculares. La presencia del factor Va acelera la proteólisis de protrombina catalizada por Xa.

Tercera etapa: formación de fibrina

El fibrinógeno (factor I) es una glicoproteína compuesta por seis cadenas polipeptídicas (dos Aα, dos Bβ y dos γ) unidas entre sí por puentes disulfuro. Predomina marcadamente el eje longitudinal; es simétrica, con tres dominios globulares conectados por segmentos fibrilares (fig. 31-3). Cada mitad de la molécula está formada por la asociación de tres cadenas (Aα, Bβ y γ). En la porción fibrilar que une el dominio central con cada una de las "cabezas" globulares distales, esas cadenas se enrollan sobre el mismo eje formando una triple hélice. Los extremos aminoterminales de las seis cadenas se encuentran en el dominio central; los correspondientes a Aα y Bβ emergen como cabos libres en la zona media de la molécula (fig. 31-3). Estos extremos comprenden las porciones A y B

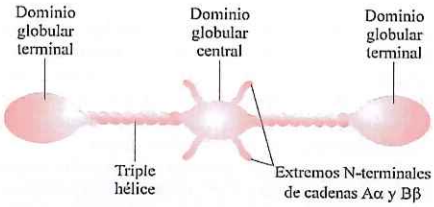


Fig. 31-3. Esquema de fibrinógeno. Se representa una molécula con sus extremos globulares y el dominio central menor, del cual sobresalen los extremos N-terminales de cadenas Aα y Bβ. El dominio central está unido a los distales por un segmento en triple hélice formado por las cadenas α, β y γ.

de las cadenas Aα y Bβ, respectivamente, ricas en restos aspartato y glutamato. En el terminal de las cadenas Bβ se encuentran también restos tirosina-O-sulfato, formados postraducción. Estos grupos contribuyen a crear una zona electronegativa en la región central y son responsables de la repulsión mutua de las moléculas que ayuda a mantenerlas en solución.

La α-trombina ataca enlaces arginil-glicina en los segmentos N-terminales libres de las cadenas Aα y Bβ, separando cuatro péptidos, el segmento A, de 18 aminoácidos, de cada una de las cadenas Aα, y el B, de 20 aminoácidos, de las cadenas Bβ (fig. 31-4). Estos péptidos son denominados *fibrinopéptidos*; el resto de la molécula es un *monómero de fibrina*, de composición $(\alpha\beta\gamma)_2$. La eliminación de los fibrinopéptidos ricos en grupos electronegativos hace desaparecer las causas de repulsión intermolecular; los monómeros de fibrina tienden a polimerizarse de manera espontánea, formando asociaciones altamente ordenadas. Los

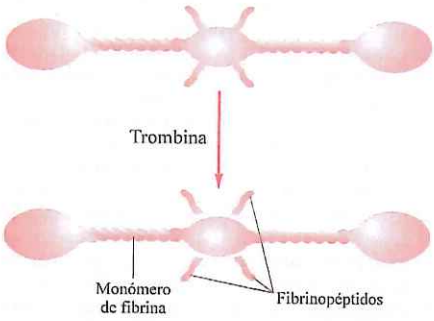


Fig. 31-4. Representación esquemática de la hidrólisis de fibrinógeno por acción de α-trombina. En la parte inferior se muestra el monómero de fibrina resultante de la escisión de cuatro fibrinopéptidos, dos A y dos B.

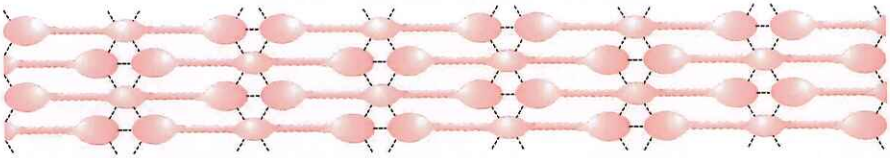


Fig. 31-5. Esquema de un segmento del haz formado por polimerización de monómeros de fibrina, que se disponen ordenados regularmente en hebras paralelas. Dos cabezas vecinas en una hebra establecen atracciones con un dominio central de otra hebra.

monómeros se disponen uno a continuación de otro, cabeza con cabeza, en largas hebras lineales, que se aparean con otras gracias a atracciones (probablemente electrostáticas y/o puentes de H) entre dos cabezas globulares próximas de una hebra y un dominio central de otra hebra adyacente (fig. 31-5).

Estabilización de la fibrina. Los haces de hebras paralelas formados por la fibrina constituyen una red laxa, que no puede cumplir su papel de formar un coágulo estable si no es reforzada por enlaces covalentes, a manera de puentes entre hebras vecinas. La formación de esas uniones es catalizada por una transamidasa (factor XIIIa o *transglutaminasa*). Esta enzima se genera a partir del factor XIII por acción de la α-trombina. La transglutaminasa cataliza la formación de un enlace amídico entre restos glutamina y lisina de monómeros de fibrina en hebras adyacentes. En la reacción se libera NH_4^+ (fig. 31-6).

Regulación de la coagulación

Corrientemente la formación del coágulo se limita a la zona de la pared vascular lesionada. Este hecho indica la existencia de mecanismos de regulación, ya que si la coagulación ocurriese sin control, produciría taponamiento masivo de los vasos (trombosis).

Varios mecanismos intervienen en la regulación de la cascada de reacciones: a) El flujo normal de la sangre en los vasos arrastra factores coagulantes activos formados en exceso en el lugar de la lesión y posteriormente los diluye en el torrente circulatorio. Cuando existe rémora en el flujo sanguíneo (por ej. estasis venosa) se favorece la formación de trombos. b) El hígado cumple una tarea de remoción y degradación de factores activos en circulación. c) La eliminación de factores procoagulantes es promovida por la unión de α-trombina a un receptor de superficie de células endoteliales, la *trombomodulina* (TM). El complejo α-trombina-TM cataliza la activación de un zimógeno existente en el plasma, la *proteína C* (PC). Esta proteína es dependiente de vitamina K; en su forma activa (APC) es una serina proteasa que hidroliza las proteínas VIIIa y Va de los complejos tenasa intrínseca y protrombinasa respectivamente. La actividad hidrolítica de APC es estimulada por *proteína S*, que posee dominios Gla. Es de notar el doble papel de la α-trombina: cataliza la formación de fibrina, y una vez que el proceso está en marcha, ejerce acciones tendientes a frenarlo, promoviendo la eliminación de factores coagulantes. d) En el plasma existen inhibidores de factores coagulantes activos. El principal es la *antitrombina III*, glicoproteína de 60 kDa que inactiva irreversiblemente a la trombina y también a otros factores, como calicreína, IXa, Xa, XIa y XIIa. Pacientes con deficiencia de

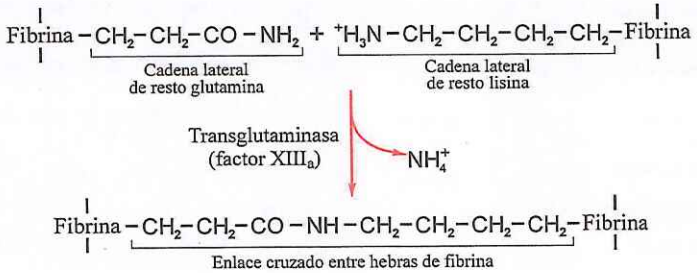


Fig. 31-6. Formación de enlaces cruzados entre hebras vecinas de fibrina.

Tabla 31-1. Factores de coagulación de la sangre.

Nº	*Nombre*	*Masa molecular (kDa)*	*Concentración en plasma (mg por dL y mol)*	*Función*
I	Fibrinógeno	340	250-400 (7 μM)	Se convierte en fibrina por acción de la trombina. La fibrina constituye una red que engloba células de la sangre y forma el coágulo.
II	Protrombina	72	10-14 (1,4 μM)	Es activada a trombina por factor Xa. La trombina cataliza la transformación de fibrinógeno en fibrina.
III	Tromboplastina o factor tisular	44	-	Liberada por daño celular. En interacción con factor VIIa participa en la activación del factor X en la vía extrínseca.
IV	Iones calcio	-	4-5 (1,25 μM)	Median la unión de factores IX, X, VII Y II a fosfolípidos.
V	Proacelerina	350	1 (20 nM)	Potencia la acción de Xa sobre la protrombina.
VI	No existe	-	-	-
VII	Proconvertina	45-54	0,05 (10 nM)	Participa en la vía extrínseca. Forma un complejo con factor III y Ca^{2+} que activa al factor X.
VIII	Factor antihemofílico (VIII:C)	285	0,1-0,2 (0,7 nM)	Indispensable, en asociación con el factor IXa, para la activación del factor X. Su ausencia es la causa de la hemofilia A.
	Factor von Willebrand (VIII:R)	Polím. > 10.000	-	Media la unión de plaquetas al colágeno en subendotelio vascular. Su ausencia es la causa de la enfermedad de van Willebrand.
IX	Factor Christmas	57	0,3 (90 nM)	Convertido en IXa por XIa. El complejo IXa-VIII-Ca^{2+} activa el factor X. Su ausencia es la causa de la hemofilia B.
X	Factor Stuart-Prower	59	1 (170 nM)	Activado por el complejo IXa-VIII-Ca^{2+} en la vía intrínseca, o por VIIa-III-Ca^{2+} en la extrínseca. Convertido en Xa cataliza la hidrólisis de protrombina para formar trombina.
XI	Tromboplastina plasmática o antecedente trom boplastínico del Elasma	160	0,5 (30 nM)	Convertido en proteasa XIa por acción del factor XIIa, activa al factor IX.
XII	Factor Hageman	76	-	En contacto con superficies extrañas es activado por calicreína asociada a cininógeno. Convierte al factor XI en XIa.
XIII	Pretransglutaminasa o factor Laki-Lorand	320	1-2 (70 nM)	Activado a XIIIa por trombina. Forma enlaces cruzados entre restos lisina y γ-carboxiglutaminilo en los filamentos de fibrina y los estabiliza.
XIV	Precalicreína o factor Fletcher	-	-	Activada a calicreína, juntamente con cininógeno de elevada masa molecular, convierte al factor XII en XIIa.
XV	Cininógeno de alto peso molecular o factor Fitzgerald, Flaujeac o Williams	-	-	Coadyuva con la calicreína en la activación del factor XII.
XVI	Proteína C	62	(60 nM)	Activada a Ca se une a proteína S e hidroliza factores Va y VIII. Inhibidor.
XVII	TFPI	40	(2,5 nM)	Inhibe la vía extrínseca: bloquea el complejo VIIa y TF en presencia de Xa.
XVIII	Antitrombina III	58	0, 15 a 0,40 (2,5 nM)	Inhibidor de trombina y factores IXa y Xa.
XIX	Trombomodulina	100	-	Unida a α-trombina activa la proteína C a Ca.
XX	Proteína S	-	-	Unida a Ca facilita la acción de ésta, inhibiendo la generación de trombina.

antitrombina III sufren frecuentes complicaciones por trombosis y embolias.

La acción de la antitrombina III es notablemente estimulada por los heteropolisacáridos heparina y heparansulfato (pág. 87), compuestos que se encuentran en células cebadas y en el endotelio vascular respectivamente. Tienen acción anticoagulante porque favorecen la formación de complejos entre antitrombina III y factores coagulantes activos. La tabla 31-1 presenta los factores que participan del proceso de coagulación de la sangre.

La importancia de las proteínas anticoagulantes se refleja en el notable aumento del riesgo de trombosis en pacientes con deficiencias de esos agentes.

Aunque más débiles que la antitrombina III, otras antiproteasas del plasma, como la α_2-macroglobulina y la α_1-antiproteinasa, también inhiben a la trombina.

Fibrinólisis

Después que el coágulo se ha establecido comienza la reparación de los tejidos afectados, con formación de una cicatriz. El tapón deja de ser necesario y se procede a su disolución por digestión de la red de fibrina.

La ruptura de la fibrina (fibrinólisis) es catalizada por *plasmina*, serina proteasa que ataca uniones peptídicas en las zonas de triple hélice de los monómeros de fibrina. La plasmina se genera a partir de un precursor inactivo, el *plasminógeno*, por acción de factores intrínsecos y extrínsecos. Los factores intrínsecos son precalicreína, XI y XII. El agente extrínseco, más potente que los anteriores, es producido por el endotelio vascular. Se denomina *activador tisular del plasminógeno*. El gen ha sido clonado y el activador es actualmente producido por métodos de ADN recombinante. Se lo utiliza en clínica para favorecer la disolución de trombos.

RESUMEN

Coagulación de la sangre. Reacciones enzimáticas en cascada. Intervienen numerosos factores. La precalicreína, la protrombina (II) y los factores VII, IX, X, XI y XII son zimógenos que se convierten en proteasas activas por hidrólisis. Los factores II, VII, IX y X son dependientes de vitamina K, la cual actúa como cofactor de carboxilaciones (la formación de γ-carboxiglutamato, quelante de Ca^{2+}, sirve para la fijación de la proteína a fosfolípidos). *Vía intrínseca*: en contacto con una superficie extraña, se adsorben precalicreína, cininógeno, XII y XI. La precalicreína es activada a calicreína; ésta, juntamente con cininógeno, convierte al factor XII en proteasa XIIa que transforma el factor XI en XIa; El XIa en presencia de Ca^{2+} transforma el zimógeno IX en IXa. Sobre los fosfolípidos de membrana de plaquetas se forma un complejo de IX, X, VIII y Ca^{2+}. El factor X se activa a Xa. *Vía extrínseca*: cuando la sangre entra en contacto con tejidos lesionados se genera rápidamente factor Xa. La activación es mediada por un complejo de VII, Ca^{2+} y tromboplastina (III). En la formación de Xa convergen las dos vías. Las dos etapas siguientes son comunes. *Formación de trombina*: el factor Xa convierte protrombina en trombina. La acción es acelerada por el factor Va, se requieren fosfolípidos y Ca^{2+} para la unión de los factores. *Formación de fibrina*: la trombina actúa sobre el fibrinógeno y lo convierte en fibrina. Primero separa cuatro pequeños fibrinopéptidos. Los monómeros de fibrina se polimerizan en haces de fibras que forman el coágulo. La red de fibrina es estabilizada por el factor XIII activado por trombina, que actúa como transamidasa, formando puentes entre restos glutamina y lisina de hebras vecinas. *Regulación*: se eliminan factores procoagulantes. El complejo α trombina-trombomodulina activa la proteína C del plasma, que degrada los factores Va y VIIIa. Existen inhibidores de proteasas, como la antitrombina III que inactiva trombina, calicreína, IXa, Xa, XIa, y XIIa. La acción de la antitrombina III es potenciada por heparina. *Fibrinólisis*: la disolución del coágulo es producida por hidrólisis de la fibrina, catalizada por plasmina, que se genera a partir de plasminógeno. El principal factor de conversión es el activador tisular del plasminógeno.

BIBLIOGRAFÍA

Broze G.T. (1997). Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. *Annual Review of Medicine*, 46: 103-112.

Kalafatis M., Egan J.O., van't Veer C., Cawthern K.M., Mann K.G. (1997). The regulation of clotting factors. *Critical Reviews in Eukaryotic Gen Expression*, 7: 241-280.

Scully M.F. (1992). The biochemistry of blood clotting: the digestion of a liquid to form a solid. *Essays in Biochemistry*, 27: 17-36.

CAPÍTULO 33

Apoptosis

En los tejidos de todo individuo normal constantemente ocurre una remoción controlada de células por un proceso llamado *muerte celular programada* o *apoptosis* (del griego, caída de los pétalos de una flor o de las hojas de un árbol).

Este proceso cumple diversas funciones: a) elimina células innecesarias, dañadas o portadoras de alteraciones que las tornan peligrosas (ej.: células invadidas por virus o potencialmente cancerígenas); b) atrofia de estructuras definidas en órganos que experimentan cambios cíclicos inducidos por hormonas (ej.: glándula mamaria al finalizar la lactancia); c) en el sistema inmunitario, destrucción de linfocitos que no alcanzaron una recombinación génica satisfactoria o cuya especificidad las hace agresivas para tejidos del propio individuo (pág. 672); d) durante el desarrollo, la apoptosis suprime formaciones embrionarias que no deben persistir en la vida extrauterina (ej.: membranas interdigitales), o células que se producen en exceso (se estima que el 50% de las células del cerebro son eliminadas antes del nacimiento). En un adulto normal se destruyen por apoptosis más de diez mil millones de células por día.

Las células condenadas a esta muerte programada muestran una serie de cambios morfológicos característicos: las células disminuyen de tamaño debido a la ruptura de filamentos del citoesqueleto, el citoplasma y el núcleo se condensan, el ADN es escindido por una endonucleasa en los segmentos entre nucleosomas, con la consiguiente fragmentación de la cromatina nuclear en trozos de 200 pares de bases y de múltiplos de 200. También se fragmentan organelas como el aparato de Golgi, retículo endoplásmico y mitocondrias; la membrana plasmática adquiere el aspecto de estar "ampollada", la célula se redondea, se separa de las que estaban asociadas a ella y se desintegra en vesículas rodeadas por membrana. Finalmente, estos fragmentos son englobados por células vecinas o por macrófagos y desaparecen sin dejar rastros.

Uno de los cambios observados en las células que sufren apoptosis es la translocación de fosfatidilserina en la membrana plasmática. Normalmente este fosfolípido está localizado sólo en la hoja interna de la bicapa lipídica; en la célula condenada a morir salta a la capa externa, donde se expone como un marcador, reconocido por receptores de las células fagocitarias. La fosfatidilserina en la superficie externa sería la señal *eat me* (cómeme) de los autores de habla inglesa. Además de servir como marcador de apoptosis, la fosfatidilserina sería en parte responsable del bloqueo de factores inflamatorios que usualmente acompañan a la fagocitosis. No solo fosfatidilserina sino también otras moléculas son expuestas en la superficie de las células sentenciadas a apoptosis; entre ellas se incluyen anexina I y calreticulina. Los "saltos" de una capa de la membrana a la otra (*flip-flop*), son catalizados por enzimas llamadas flopasas y flipasas (ver pág. 199).

Los cambios mencionados establecen una clara distinción entre apoptosis y *necrosis*. Esta última, resultante de un daño agudo e intenso, lleva a la ruptura de la membrana plasmática y al vaciamiento del contenido celular en el espacio intersticial, lo que provoca una reacción inflamatoria intensa.

El descubrimiento de la apoptosis fue el resultado de estudios en un pequeño nematodo llama-

do *Caenorhabditis elegans*. Se observó, durante el desarrollo del embrión, que de un total de 1090 células se eliminaban selectivamente 131 y restaban 959 que son las componentes del nematodo adulto. En este organismo se identificaron tres genes directamente implicados en el proceso; dos de ellos, *ced-3* y *ced-4*, codifican proteínas ejecutoras de la muerte celular (CED-3 y CED-4) y el tercero, *ced-9*, dirige la síntesis de una proteína inhibidora de la apoptosis (CED-9).

Estos hallazgos alentaron la búsqueda de genes homólogos en mamíferos. Los trabajos de varios grupos de investigadores revelaron proteínas responsables de muerte celular programada en diversas especies, incluyendo la humana. Estas proteínas han sido altamente conservadas durante la evolución.

Proteínas proapoptóticas. Se han demostrado en humanos proteínas homólogas de la CED-3 inductora de apoptosis en *C. elegans*. Comprenden una familia de proteasas denominadas *caspasas*. Todas tienen un resto cisteína crítico en el sitio activo y atacan selectivamente uniones peptídicas que comprenden el grupo carboxilo de ácido aspártico. De allí el nombre *caspasas* (de *c*: cisteína, *asp*: aspartato); se las designó con números según el orden de su descubrimiento; se han descripto hasta el presente catorce.

Se encuentran en las células como zimógenos y deben ser activadas por escisión de un trozo del extremo N-terminal y ruptura hidrolítica del resto de la molécula en dos polipéptidos de distinto tamaño que se unen en un heterodímero. La asociación de dos de estos heterodímeros forma la enzima, que posee dos sitios activos. Se distingue a las caspasas apoptóticas en *iniciadoras* y *efectoras*; cuando el proceso se pone en marcha, se desencadena una cascada irreversible. Las caspasas iniciadoras se activan por autohidrólisis y éstas a su vez producen rupturas de otras hasta alcanzar la activación de las caspasas efectoras o ejecutoras responsables del ataque específico a proteínas esenciales para la sobrevida de la célula.

No todas las caspasas conocidas intervienen en apoptosis. La primera proteína homóloga de la CED-3 de nematodo encontrada en mamíferos fue la *enzima convertidora de interleuquina 1b* (ICE), cuya principal acción fisiológica es la activación de la citoquina inflamatoria IL-1b. Posteriormente se aislaron otras integrantes de la misma familia. De las caspasas restantes las efectivamente comprometidas en apoptosis son las 2, 8, 9 y 10, *iniciadoras*, y las 3, 6 y 7, *efectoras* o *ejecutoras*; las 1, 4, 5 y 12 son responsables del procesamiento de citoquinas proinflamatorias (pág. 688). La 13 sería específica de bovinos y la 14 se expresa sólo en tejidos embrionarios, pero no en adultos.

Se distingue a las caspasas apoptóticas en *iniciadoras* y *efectoras*; cuando el proceso se pone en marcha se desencadena una cascada irreversible. Las caspasas iniciadoras (8, 9, 10) se activan por autohidrólisis y éstas a su vez producen rupturas de otras hasta alcanzar la activación de las caspasas efectoras o ejecutoras (3, 6, 7), responsables del ataque específico a proteínas esenciales para la sobrevida de la célula.

Se ha calculado que unas cuatrocientas proteínas pueden ser sustrato de caspasas. Entre esas proteínas se encuentran moléculas de adhesión celular como las cadherinas, proteínas del citoesqueleto, como actina, espectrina, gelsolina, tubulina de los microtúbulos, dineína, lamina de la cubierta nuclear. La hidrólisis de numerosos factores de transcripción, de factores de iniciación y proteínas ribosomales suprime los procesos de transcripción y traducción. También es "blanco" de caspasas una proteína encargada de mantener inactiva a la endonucleasa. Su hidrólisis libera a la endonucleasa, que entonces puede alcanzar al ADN nuclear y producir fragmentación de la cromatina. Se desintegran el núcleo, el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, las mitocondrias. Finalmente la célula queda reducida a restos vesiculares que son fagocitados.

También se han reconocido en mamíferos proteínas homólogas a la CED-4 del *C. elegans*, que promueven la activación de las proteasas apoptóticas. Se las designa *APAF* (de *apoptotic protease activating factor*).

Proteínas antiapoptóticas. La CED-9 del nematodo tiene sus equivalentes en mamíferos. Son proteínas de la familia Bcl, entre ellas la *Bcl-2*. Su expresión en las células bloquea la apoptosis.

Vías que llevan a apoptosis. La muerte celular programada es desencadenada por señales que pueden proceder de estímulos externos (vía extrínseca) o del interior de la propia célula (vía intrínseca).

Vía extrínseca. Se inicia con la unión de un ligando, generalmente una citoquina de la familia del *factor de necrosis tumoral* (TNF) (pág. 687), a un receptor de factor de necrosis tumoral (TNFR), también del llamado *Fas*, que posee un dominio extracelular de unión del ligando, un segmento transmembrana y un dominio intracitoplasmático (*dominio de muerte*, DD, de *death domain*). El receptor se agrupa en homotrímeros; la fijación del ligando produce un cambio conformacional del dominio DD que le permite atraer proteínas adaptadoras como TRADD (de *TNFR*

associated death domain) o FADD (de *Fas associated death domain*). Estas proteínas contienen un *dominio efector de muerte* (DED) que interactúa con procaspasas iniciadoras (generalmente las 8 y 10). El complejo receptor-proteína adaptadora-procaspasa es llamado *DISC* (de *death inducing signalling complex*).

La proenzima es activada, sufre autohidrólisis e inicia una cascada proteolítica que pone en acción caspasas efectoras, tales como las 3 y 7, con la consiguiente degradación de moléculas esenciales para la célula.

Las interrelaciones o *crosstalk* (pág. 503) de los sistemas de señales permiten desencadenar la apoptosis desde distintas vías. Por ejemplo, durante la muerte celular programada mediada por Fas se ha observado aumento de *ceramida*, factor relacionado con el sistema Ras/MAP quinasas. La interacción de la vía extrínseca con la intrínseca es otro ejemplo de *crosstalk*.

La liberación de Ca^{2+} desde los depósitos en retículo endoplásmico también tiene un papel en la activación del programa de muerte celular.

Vía intrínseca o mitocondrial. La apoptosis puede ser activada desde el interior de la célula en respuesta a situaciones como hipoxia, falta de nutrientes y otros y agentes que causen daños en el ADN u otras estructuras de la célula. Esta vía es considerada la más importante.

En vertebrados la vía intrínseca es iniciada por la liberación de proteínas mitocondriales en el citosol. El espacio intermembrana de las mitocondrias es un reservorio de factores apoptóticos que se liberan al citosol cuando señales intracelulares determinan permeabilización de la membrana externa.

Una proteína muy importante en este proceso es el *citocromo c*, componente de la cadena de transporte de electrones localizado en la cara externa de la membrana mitocondrial interna. Cuando es liberado en el citosol asume un papel muy diferente. Se une a una proteína APAF-1 del citosol, que se polimeriza formando una especie de rueda y une moléculas de citocromo c y del zimógeno procaspasa 9. El complejo APAF-1-citocromo c-procaspasa 9 es denominado *apoptosoma*; en él la procaspasa se autoactiva a caspasa 9, que es una proteasa iniciadora y desencadena la cascada hidrolítica que determina la estimulación de caspasas efectoras (3, 6, 7).

Además de citocromo c, se liberan otras moléculas desde el espacio intermembrana de mitocondrias, entre ellas las llamadas *Diablo* y *Omi*, que activan caspasas, y la *endonucleasa G*, responsable de la degradación de ADN, condensación de la cromatina y fragmentación del ADN.

Otras vías. Una tercera vía de apoptosis es específica de linfocitos T citotóxicos (CTL) y células matadoras naturales (NK). Se induce la activación de una serina proteasa denominada *granzima B* (Gra B) que, como las caspasas, hidroliza los sustratos en uniones peptídicas de residuos aspartato. Ingresa a las células por canales formados por perforina. Gra B también activa a las procaspasas 3 y10 y también puede inducir la vía mitocondrial

Una cuarta vía de activación de caspasas, independiente de las anteriores, es activada por estrés en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi.

Regulación de la apoptosis. Ambas vías, intrínseca y extrínseca, son rigurosamente controladas para asegurar que la célula se autodestruya sólo cuando ello sea necesario. El organismo normal mantiene un equilibrio ente las células que se generan y las que se destruyen.

La principal clase de reguladores de la apoptosis son proteínas de la familia *Bcl* (de *B cell lymphoma*) ya mencionada; controlan la liberación de citocromo c y otras proteína mitocondriales intermembrana.

Dentro de la familia Bcl existen varios grupos; algunas, como la Bcl-2 son antiapoptóticas. Tienen cuatro dominios BH (de *Bcl-2 homology*), razón por la cual a estas proteínas se las denomina BH1234.

La proteína Bcl-2 inicialmente fue identificada como la codificada por el oncogén causante de desarrollo de linfomas de células B. A diferencia de otros oncogenes, por ejemplo *Ras*, que estimulan la proliferación celular, Bcl-2 es un inhibidor de la muerte celular programada, lo que favorece la sobrevivencia de las células cancerosas. En las neoplasias, la falla en la apoptosis tiene el mismo efecto que la multiplicación incontrolada. Además de Bcl-2, dentro del grupo de proteínas antiapoptóticas deben incluirse las denominadas Bcl-xL, Bcl-W, y otras con homologías en los dominios BH1-BH4.

Pero no todos los miembros de la familia Bcl son antiapoptóticos. Existe un grupo que difiere de Bcl-2 por tener tres dominios BH en vez de cuatro (se las designa BH123). A la subfamilia BH123 pertenecen las proteínas *Bax* (de *Bcl-2 associated X protein*) y *Bak* (de *Bcl-2 antagonist killer*), que son promotoras de muerte celular programada. Cuando se activa la vía intrínseca, Bax y Bak se agregan en polímeros en la cara citosólica de la membrana mitocondrial externa y forman poros que la permeabilizan y permiten el pasaje al citosol de citocromo c y otras proteínas proapoptóticas intermembrana, entre ellas las llamadas *Diablo* y *Omi*.

Otra subfamilia de las Bcl proapoptóticas sólo tienen el dominio BH3.

El destino de la célula depende del equilibrio entre proteínas pro y anti, que antagonizan y se anulan unas a otras. Las proteínas Bax y Bak son inhibidas por Bcl-2. BH3 bloquea a Bcl-2, lo que altera el balance a favor de la apoptosis.

Tanto en la vía intrínseca como en la extrínseca, intervienen como reguladoras proteínas inhibidoras de la apoptosis designadas con las siglas IAP. Las IAP interactúan directamente con caspasas y suprimen la apoptosis, ya sea inhibiendo a esas enzimas o marcándolas para su ubicuitinación y posterior degradación en los proteasomas (pág. 328).

Las proteínas Diablo y Omi, liberadas del espacio intermembrana, estimulan la actividad de caspasas interfiriendo la acción de las IAP.

Una función importante de la muerte celular programada es la eliminación de células dañadas, especialmente las que han sufrido alteraciones de su ADN. Estas células son peligrosas ya que pueden acumular mutaciones que las convierten en carcinogénicas. Muchas células neoplásicas producen un exceso de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-1.

En las células de mamíferos existen mecanismos que se oponen a la transformación maligna. En respuesta al daño en el ADN, estos mecanismos son mediados por el factor de transcripción p53 (proteína supresora de tumores), que induce la expresión de inhibidores de ciclinas y detiene la progresión del ciclo celular. Además de esta acción, se ha observado que p53 también es capaz de activar la apoptosis por inducción de la expresión de la proteína BH3, desencadenante de la vía intrínseca.

Importancia médica. Numerosas enfermedades se acompañan de perturbaciones en la regulación de la apoptosis. En la enfermedad de Alzheimer y otras patologías neurodegenerativas hay destrucción exagerada de neuronas en determinadas regiones del cerebro. También existe incremento de la actividad apoptótica de linfocitos T en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida).

Ejemplos de incremento en la destrucción celular son los infartos de miocardio y los accidentes cerebrovasculares. En estos cuadros predomina la necrosis resultante de la falta de provisión de oxígeno, pero, además, otras células afectadas por la hipoxia mueren por apoptosis. Se espera que el desarrollo de fármacos inhibidores de caspasas sea útil en estos cuadros.

Cuando existen mutaciones que afectan genes codificantes de factores relacionados con la muerte celular programada pueden producirse problemas serios. Una falla en el gen que dirige la síntesis de receptores de muerte Fas bloquea la eliminación de linfocitos y determina su acumulación en bazo y ganglios linfáticos, lo que es causa de enfermedades autoinmunes.

La eliminación de células indeseables está alterada en algunos tipos de tumores. En un cáncer común de células linfocitarias (linfoma) existe una translocación cromosómica que determina producción excesiva de proteína Bcl-2 y con ello inhibición de la apoptosis. En el 50% de los cánceres humanos se han comprobado mutaciones en el gen de la proteína p53. Algunos de los fármacos usados en el tratamiento de neoplasias inducen apoptosis y detención del ciclo celular por un mecanismo dependiente de p53. En los casos en los cuales el gen de p53 tiene una mutación que inhabilita a la proteína, las células cancerosas no son sensibles a la quimioterapia.

RESUMEN

Apoptosis. También llamada *muerte celular programada*. En un nematodo se habían demostrado proteínas implicadas en este proceso y posteriormente se encontraron equivalentes en mamíferos. Las proteínas proapoptóticas son cisteína proteasas llamadas *caspasas* (se encuentran en las células como zimógenos y son activadas por hidrólisis); se distinguen en iniciadoras y efectoras. La apoptosis es desencadenada por estímulos desde el exterior (vía extrínseca) o del interior celular (vía intrínseca). *Extrínseca*: una citoquina (TNF) se une a su receptor en membrana plasmática (TNFR) y éste activa a proteínas adaptadoras (FADD o TRADD), que interactúan con procaspasas iniciadoras para formar el complejo DISC. La procaspasa es activada e inicia la cascada proteolítica; se estimulan caspasas efectoras, que degradan proteínas esenciales y determinan la muerte de la célula. *Intrínseca*: factores estresantes pueden determinar la liberación desde el espacio intermembrana de las mitocondrias hacia el citosol de proteínas (citocromo c y otras); la formación de complejos de APAF-1, citocromo c y procaspasa 9 (apoptosomas) activa a la proteasa e inicia la cascada de hidrólisis que lleva a la destrucción celular.

BIBLIOGRAFÍA

Danial N.N., Korsmeyer S.J. (2004). Cell death: Critical control points. *Cell*, 116: 205-219.
Delhalle S. y col. (2003). An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1010: 1-8.
Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35: 495-516.
Hassan M., Watari H., Almaaty A.A., Ohba Y., Sakuragi N. (2014). Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomedical Research International*, 2014: 1-23.
Moldoveanu T., Follis A.V., Kriwacki R.W., Green D.R. (2014). Many players in BCL-3 family affairs. *Trends in Biochemical Sciences*, 39: 101-111.
Newmeyer D.D. (2003). Releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*, 112: 481-490.
Pop C., Salvesen G.S. (2009). Human caspases: activation, specificity and regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 21777-21781.
Shiozaki E.N., Shi Y. (2004). Caspases, IAC and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends in Biochemical Sciences*, 29: 486-494.
Taylor R.C., Cullen S.P., Martin S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9: 231-241.
Varfolomeev E.E., Ashkenazi A. (2004). Tumor necrosis factor: An apoptosis juNKie? *Cell*, 116: 491-497.

Índice alfabético

A

Abetalipoproteinemia, 299
Absorción intestinal, 241
  de agua y electrólitos, 244
  de hidratos de carbono, 241
  de lípidos, 242
  de proteínas, 243
Acatalasemia, 194
Acción(es)
  de antibióticos, 451
  lipotrópica, 608
  postraducción, 471
Aceites, 101
Acetaldehído, 403
  deshidrogenasa, 403
  toxicidad del, 403
Acetato activo, 269
  transferencia de, 307, 309
Acetil-Co A, 269, 306, 341
Acetil-CoA carboxilasa, 309, 390, 600
Acetilcolina, 562
Acetilcolinesterasa, 567
Acetiltransferasa, 309
Acetoacetato, 304, 305
Acetoacetil deacilasa, 305
Acetona, 304, 305
Acidemia, 630
Acidez titulable de la orina, 628
Acidificación de la orina, 628
Ácido(s), 14
  aldáricos, 80
  aldónicos, 80
  δ-aminolevulínico, 357
  ascórbico (ver vitamina C), 601
  aspártico, 27
  biliares, 236
  cítrico, 270
  clorhídrico, 230
    producción en estómago, 230
    aclorhidria, 232
    hiperclorhidria, 233
    hipoclorhidria, 232
cólico, 236
conjugado, 15
constantes de ionización, 15
curva de titulación, 18
débiles, 15
deshidroascórbico, 605
desoxicólico, 236
desoxirribonucleico (ver ADN), 118
2,3-dicetogulónico, 605
fijos, 622
fólico, 600
  absorción intestinal, 601
  antivitaminas, 602
  avitaminosis, 602
  fuentes naturales, 601
  metabolismo, 601
  papel funcional, 601
  química, 600
  requerimiento, 602
  sinonimia, 600
folínico, 601
fosfatídico (s), 104, 315, 316
  aciltransferasa, 315
  fosfohidrolasa, 315, 494
fuertes,15
fusídico, 453
γ-aminobutírico, 28, 343, 563
γ-carboxiglutámico, 28, 583
glicocólico, 236
glucárico, 80
glucónico, 80
glucurónico, 80
glutámico, 27
graso(s), 95
  activación de, 300
  biosíntesis de, 306
    regulación de la, 390
  catabolismo de, 300
  comunes, 96
  elongación de, 311
  esenciales, 100, 102, 311
  formación de ésteres de, 99
  formación de sales de, 98
  halogenación, 99
  hidrogenación, 99
  indispensables, 100, 102, 311
  insaturados *trans*, 102
  isomería geométrica de, 97
  metabolismo de, 300
    regulación del, 389
  número de iodo, 99
  omega-3, 99
  oxidación de, 99
    balance energético, 304
    insaturados, 303
    en peroxisomas, 303
    oxidación de, 303
  α-oxidación de, 303
  β-oxidación de, 301
  ω- oxidación de, 303
  poliinsaturados, 100, 102, 311
  propiedades físicas de, 97
  propiedades químicas de, 98
  saturados, 95
  sintasa, 308
  solubilidad de, 97
  temperatura de fusión, 97
hialurónico, 86
hipúrico, 350
homogentísico, 345, 348
idurónico, 86
insaturados, 95,

linoleico conjugado, 103
lipoico, 268, 609
papel funcional, 268, 609
lisérgico, dietilamina del, 349
litocólico, 236
malónico, 154
mevalónico, 320
murámico, 81
nalidíxico, 416
neuramínico, 81
nicotínico, 171, 349, 589
nucleicos, 115, 117
orótico, 373
p-aminobenzoico, 155
pantoico, 596
pantoténico, 595
acciones farmacológicas, 597
avitaminosis, 597
fuentes naturales, 596
papel funcional, 596
requerimientos, 597
química, 596
sinonimia, 595
piroglutámico, 352
quenodesoxicólico, 236
retinoico, 576
ribonucleico (ver ARN), 126
ruménico, 103
sacáricos, 80
según Bronsted y Lowry, 14
siálicos, 81
taurocólico, 236
tetrahidrofólico, 601
tióctico, 268, 609
úrico, 370, 371
urónicos, 80
vainillilmandélico, 531
vanilmandélico, 531
volátiles, 622
Acidosis, 630
láctica, 270
metabólica, 630
respiratoria, 630
Aciduria
mevalónica, 323
orgánica, 301, 342
orótica, 373
Acilcarnitina, 300
Acil-CoA-, 300
colesterol-aciltransferasa, 296, 319, 321
deshidrogenasa, 301
sintetasa, 300
Acilglicéridos, 100
Acilgliceroles, 100
biosíntesis, 315
hidrogenación, 102
hidrólisis, 101
isomerías, 100
oxidación, 102
propiedades físicas, 101
propiedades químicas, 101
punto de fusión, 101
solubilidad, 101
Aclorhidria, 233
Aconitasa, 270
Acromegalia, 515
ACTH, 515
Actina, 65
Actinomicina D, 452
Actividad óptica, 25
Activina, 550
Acuaporinas, 211
Adaptinas, 221
Adenilato(s)
ciclasa, 494
papel regulador, 393
quinasa, 392, 406
Adenina, 115
-fosforribosil transferasa, 369
Adenohipófisis, 513
hormona
adrenocorticotrófica (ACTH), 515
de crecimiento, 517
gonadotrofinas, 515
melanocitoestimulante, 515
prolactina, 516
somatotrofina, 517
tiroestimulante, 515
Adenosil-ribosa cíclico, 590
Adenosina ,116
monofosfato-3',5'-cíclico, 131
trifosfato (ATP), 130, 139, 165
desaminasa, 370
Adhesión celular, 224
ADN, 118
amplificación de, 431
biblioteca de ADNc, 433
circular, 125
conformaciones, 120
desnaturalización de, 122
electroforesis de, 427
estructura molecular, 118
fingerprinting, 432
hibridación de, 123
marco de lectura abierto, 445
mitocondrial, 125, 442
nuclear, 440
polimerasas, 416, 419
transcriptasa inversa, 426
recombinación, 420
recombinante, 428
aplicación, 435
renaturalización de, 122
reparación, 419
satélite, 124
sondas de, 433
vacunas de, 435
ADP-ribosa cíclico, 594
ADP ribosilación, 478
Adrenalina, 346, 534
Adrenodoxina, 187
reductasa, 187
Adrenoleucodistrofia, 303
Aglicona, 79
Agua, 9
balance del, 614
como electrólito, 12
como solvente, 11
constante de ionización, 15
distribución, 613
equilibrio de ionización, 13
extracelular, 614
determinación, 614
intracelular, 614
polaridad de la molécula, 9
total (determinación), 613
Ajuste inducido, 149
Alanina, 26
Albinismo, 348
Albúmina, 47, 60
Alcalosis, 630
metabólica, 630
respiratoria, 630
Alcaptonuria, 348
Alcohol deshidrogenasa, 402
Aldolasa A, 264
Aldolasa B, 279
Aldol reductasa, 280
Aldopentosas, 116
Aldosas, 73
productos de oxidación, 80
productos de reducción, 79
Aldosterona, 528
Aldosteronismo primario, 534
α-cetoglutarato deshidrogenasa, 271
Almidón, 83
resistente, 238
Alopurinol, 372
Amilasa
pancreática, 234
salival, 229
Amilina, 558
Amiloidosis, 476
Amilopeptina, 83
Amilosa, 83
Aminas biológicas, 342
biosíntesis de, 342
Aminoácidos, 24
ácidos dicarboxílicos, 27
activación de, 447
alifáticos
cadena no polar, 26
cadena polar no ionizable, 26
básicos, 27
biosíntesis de, 342
catabolismo de, 332
cetogénicos, 340
clasificación, 26
con azufre, 27
con selenio, 28
descarboxilación de, 342
destino de, 331, 340, 341
en reacciones desintoxicación, 350
esenciales, 48, 329
glucogénicos, 340
metabolismo de, 327
metabolitos intermedios, 341
neutros aromáticos, 26
pool de, 327
propiedades ácido-base de, 29
propiedades químicas de, 31
transporte de, 332
defectos genéticos del, 332
Aminoacil-ARNt sintetasas, 447

Aminoazúcares, 81
Aminopeptidasas, 235, 240
Aminotransferasas, 332
Amoníaco
producción en riñón, 628
toxicidad del, 339
vías metabólicas, 335
AMP cíclico (AMPc), 131
AMP quinasa, 393
Amplificación de ADN, 431
Anafilotoxinas, 679
Anemia
de Fanconi, 420
falciforme, 57
perniciosa, 604
Angiotensina, 559
Angiotensinógeno, 559
Anhidrasa carbónbica, 231
Anhídrido carbónico
transporte de, 96, 620
Animales transgénicos, 462
Aniones restantes, 632
Anión superóxido, 190
Anómeros, 76
Antagonistas metabólicos, 155
Antibióticos
bloquean replicación, 452
bloquean traducción, 453
bloquean transcripción, 452
Anticonceptivos orales, 549
Antifólicos, 375
Anticodón, 127
Anticuerpos, 663
monoclonales, 675
variabilidad de, 673
Antígeno, 663
naturaleza del, 669
procesamiento del, 679
reconocimiento del, 679
Antioxidantes, 189
nutrientes, 194, 195
regeneración de, 195
Antípodas ópticos, 72
Apoenzima, 146
Apolipoproteínas, 293
Apoptosis, 703
importancia médica, 706
regulación, 705
vía extrínseca, 704
vía mitocondrial, 705
Otras vías, 705
Arginasa, 327
Arginina, 27
Argininosuccinato, 336
sintetasa, 336
ARN, 126
de transferencia (ARNt), 127, 446
iniciador, 416
interferencia por, 470
largo no codificante,
mensajero (ARNm), 126, 443
cap, 425
"cola" de poli A, 126, 425
"maduro" o final, 424, 445
otros, 128
no codificante, 472
pequeños, 471
polimerasa(s), 422, 423
transcriptasa inversa, 426
precursor, 423
procesamiento, 425, 443
splicing, 443
alteraciones del, 444
diferencial, 443
nuclear heterogéneo, 126
nuclear pequeño, 128
ribosomal (ARNr), 128
síntesis de, 445
iniciador, 416
polimerasas, 416, 422
precursor del mensajero, 423
Arriboflavinosis, 593
Asparragina, 27
Aspartato transcarbamilasa, 373
Ataxia telangiectásica, 420
Ateroesclerosis, 192, 297
ác. grasos insaturados y, 311
ATP, 130, 139, 165
ATPasas clase P, 213
Ca^{2+}-ATPasa, 215
H^+,K^+-ATPasa, 216
Na^+,K^+-ATPasa, 213
ATPasas clase V, 216
ATPasas tipo F, 216
ATP sintasa, 177
Autocatálisis, 231
Avidina, 599

B

Bacteriófago, 129, 464
Balance energético
de la oxidación de glucosa, 274
Balance hídrico, 614
Base, 9
conjugada, 15
Beriberi, 590
β-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, 301
β-oxidación de ácidos grasos, 301
Bilirrubina, 238
diglucurónido de, 362
directa, 363
-glucuronil transferasa, 362
indirecta, 363
transporte en sangre, 362
Bilis, 236
composición, 236
Bilitranslocasa, 362
Biliverdina, 238, 362
reductasa, 362
Biología molecular, 3
Bioenergética, 165
Biología molecular
métodos utilizados en, 427
Biopterina, 345
Bioquímica
descriptiva, 1
dinámica, 1
Biosíntesis de
ácidos grasos, 306, 308
no saturados, 310
catecolaminas, 346
colesterol, 319
desoxirribonucleótidos, 374
eicosanoides, 312
fosfolípidos, 316
hemo, 357
nucleósidos di- y trifosfato, 374
pirimidinas, 372
proteínas, 439
mecanismo, 447
purinas, 367
serotonina, 348
triacilgliceroles, 315
Biotina, 599
absorción intestinal, 599
avitaminosis, 600
fuentes naturales, 599
metabolismo, 599
papel funcional, 599
química, 599
requerimientos, 600
transporte, 599
sinonimia, 599
Biotinidasa, 599
Biotransformación, 400
conjugación, 401
excreción, 402
hidrólisis, 402
oxidación, 401
reducción, 402
Bisfosfofructosa fosfatasa, 278
2,3-bisfosfoglicerato, 55
Bocio endémico, 526, 655
Bocio simple, 626, 655
Bomba de sodio, 213
Bradiquinina, 560
Bronsted y Lowry, 14
Buffer, 16

C

Ca^{2+}-ATPasa, 215
de membrana plasmática, 215
de retículo sarcoplásmico, 215
Cadaverina, 342
Cadena de transporte electrónico, 171
Cadena respiratoria, 171
deficiencias genéticas, 183
componentes de la, 172
complejo I, II, III y IV, 175
inhibidores de la, 176
Cadherinas, 225
Caja
de Hogness-Goldberg, 424
de Pribnow, 424
Calbindina, 582, 640
Calciferol, 579
Calcio, 639
absorción intestinal, 640
alteraciones de homeostasis, 642
balance del, 641
calcemia, 640

deficiencia, 643
excreción, 640
fuentes naturales, 640
homeostasis del, 641
manejo renal del, 640
regulación Ca^{2+} intracelular, 642
requerimiento, 643
Calcitonina, 553
Calcitriol, 560, 581
Cálculos biliares, 238
Calmodulina, 502
Caloría, 134
Cambio de energía
libre estándard, 136
Canales, 208
de agua (acuoporinas), 211
de cloruros, 210
de iones, 208
de K^+, Na^+ y Ca^{2+}, 209
de K^+ independientes de voltaje, 210
de Na^+ sensibles a amilorida, 210
dependientes de ligandos, 210
de nucleótidos cíclicos, 210
de voltaje, 209
entre células, 212
Cápsida, 128
Capsómero, 129
Carbamilfosfato sintetasa, 336, 337, 371
Carbohidratos (hidratos de carbono), 72
Carbono asimétrico, 24
Carboxihemoglobina, 56
Carboxipeptidasas, 234, 240
Cardiolipina, 105
Carga de energía, 393
Carnitina, 300, 608
deficiencia de, 301, 608
funciones, 608
usos sin fundamentos, 608
Carnitina aciltransferasa, 301
Carotenos, 575
Carotenoides, 195, 575
Caspasas, 704
efectoras, 704
iniciadoras, 704
Catabolismo de
ácidos grasos, 300
aminoácidos, 332
hemo, 361
pirimidinas, 374
purinas, 370
Catalasa, 194
Catálisis enzimática, 147
Catalizadores, 143
Catecolaminas, 346, 530, 563
biosíntesis de, 346, 530
inactivación, 531
mecanismo de acción, 531
alteraciones, 533
Catecol-O-metil transferasa, 346
Catepsina, 232
Caveolina, 222
Cefalina, 104
Celobiosa, 82
Células
beige, 184
de memoria, 668
T auxiliares, 679
T citotóxicas, 679
Celulosa, 85
Centros Fe-S, 173
Ceramida, 107
Ceras, 103
Cerebrósidos, 108
biosíntesis de, 317
Ceruloplasmina, 650
3-cetoacil reductasa, 309
Cetoacil sintasa, 308
17-cetoesteroides, 526
Cetogénesis, 304
Cetonuria, 306
Cetosas, 74
Cetosis, 305
Chaperonas, 475
Chaperoninas, 476
Ciclinas, 415
Ciclo
celular, 413
del ácido cítrico, 270
de ácidos tricarboxílicos, 270
balance energético, 275
consideraciones generales, 273
papel funcional, 274
regulación, 388
de Cori, 280
de la urea, 336
consideraciones sobre, 337
errores congénitos del, 338
de Krebs, 270
de Krebs-Henseleit, 336
del γ-glutamilo, 352
de Randle, 392
de vitamina K, 588
enterohepático, 363
glucosa-alanina, 392, 400
metabólico, 248
pentanoperhidrofenantreno, 109
Q, 179
ribosomal, 447
Ciclooxigenasa, 313
Cinética de respuesta inmune, 663
Cinética química, 140
Circulación enterohepática, 237
Cisteína, 27
Cistina, 29
Cistinuria, 332
Citosina, 115
Citocromo oxidasa
Citocromo, 174
a, 174
b, 174
c, 39, 174
oxidasa, 176
P_{450}, 187, 401
Citoquinas, 687
funciones, 688
propiedades generales, 687
receptores de, 688
Citrato liasa, 307
Citrato sintasa, 270
Citrulina, 336
Clatrina, 220
Clonación de genes, 433
Cloruro, 638
absorción, 638
alteraciones del balance, 639
en plasma, 639
excreción, 639
fuentes naturales, 638
manejo renal, 639
Coagulación de la sangre, 695
etapas de la, 696
factores de, 696
fibrinólisis, 697
formación de fibrina, 694
formación de trombina, 693
regulación, 699
vía extrínseca, 697
vía intrínseca, 696
Coatómeros, 223
Cobalamina, 602
absorción intestinal, 603
avitaminosis, 604
acciones farmacológicas, 605
fuentes naturales, 603
metabolismo, 603
papel funcional, 603
química, 602
requerimientos, 604
sinonimia, 602
Cobalto, 658
Cobre, 654
absorción, 654
deficiencia, 655
excreción, 654
fuentes naturales, 654
funciones, 654
transporte, 654
Cociente respiratorio, 410
Código genético, 440
degeneración del, 440
Codones, 440
Coeficiente
de difusión, 205
de partición aceite/agua, 205
de permeabilidad, 205
de temperatura, 153
Coenzima, 146
Coenzima A, 592
Coenzima B_{12}, 603
Coenzima Q, 173, 194
Colágeno, 49
Colecalciferol, 580
Colecistoquinina, 237, 557
Colesterol, 111
biosíntesis, 319
catabolismo de, 322
excreción de, 322
metabolismo de, 319
papel del hígado, 322
regulación, 322
transporte invertido de, 296
Colesterolesterasa, 234
Colina, 607
absorción, 607
deficiencia de, 607

fuentes naturales, 607
funciones, 607
requerimientos, 607
Complejidad, 3
Complejo(s)
α-cetoglutarato deshidrogenasa, 271
de ataque de membrana, 673
de cadena respiratoria, 175
de Golgi, 204
de iniciación de transcripción, 424
F_0F_1, 177
síntesis de ATP en el, 181
GroEl y GroES, 476
mayor de histocompatibilidad, 677
multimoleculares, 44
piruvato deshidrogenasa, 268
vitamínico B, 589
Complemento, 675
complejo de ataque, 677
factores de regulación, 678
funciones, 678
vía alternativa, 678
vía clásica, 675
vía de lectina, 679
Composición
iónica de líquidos corporales, 615
minerales esenciales, 635
química
de seres vivientes, 7
de tejidos humanos, 8
Compuestos
apolares, 11
anfifílicos o anfipáticos, 11, 106
de alta energía, 138
dextrógiros, 25
iónicos, 11
levógiros, 25
polares no iónicos, 11
quirales, 24
Concentración de H^+ de líq. corpor., 622
regulación, 624
renal, 627
respiratoria, 626
Concepto
de logaritmo, 21
oxidación y reducción, 166
de pH, 15
Condroitinsulfato, 86
Conexina, 212
Conexones, 212
Conmutador
aspartato-malato, 185
de citrato, 307
glicerofosfato, 185
Constante de equilibrio, 12, 136
Michaelis-Menten, 152
Control respiratorio, 183
Contracción muscular, 66
Corazón, 560
factor natriurético atrial, 560
Corteza suprarrenal, 527
alteraciones, 533
hormonas, 527
acciones, 531
biosíntesis, 528
inactivación y excreción, 530
mecanismo de acción, 530
regulación secreción, 530
transporte, 530
corticoides androgénicos, 528, 533
corticoides sintéticos, 533
glucocorticoides, 527, 531
mineralocorticoides, 528, 532
Cortisol, 528
Contratransporte, 206
Cotransporte, 206
Creatina
síntesis de, 351
Creatinafosfato quinasa, 351
Creatinina, 352
Cremallera de leucina, 469
Cretinismo, 521, 652
Cromatina, 123
condensación de, 454
Cromatosoma, 124
Cromoproteínas, 48
Crotonasa, 301
Cuerpos cetónicos, 304
utilización de, 305
Curva de
disociación de O_2 y Hb, 53
titulación
de ácidos y bases, 18
de aminoácidos, 30

D

Dalton, 32
Deacilasa, 310
δ-aminolevulinato, 358
deshidrasa, 358
sintasa, 357
Dedos de zinc, 469
Deposición de plaquetas, 695
Dermatansulfato, 86
Descarboxilación oxidativa
de piruvato, 268
regulación, 387
Desacoplantes, 182
Desaminación, 335
Desenrollasa, 422
Deshidratación, 620
7-deshidrocolesterol, 111, 580
Deshidroepiandrosterona, 529
Desoxiazúcares, 79
Desoxirribonucleótidos
biosíntesis de, 374
Desoxirribosa, 80, 116
Despolarización, 410
Determinación de agua total, 609
Determinante antigénico, 663
Dextranos, 84
Dextrinas, 84
Diabetes insípida, 517
Diabetes mellitus, 545
experimental, 547
tipo 1, 545
tipo 2, 545
Diacilglicerol, 496
Diálisis, 37
Diastereoisómeros, 72
Dicer, 457
Dicumarol, 588
Difusión, 204
coeficiente de, 205
facilitada, 206
transportadores de, 207
Digestión, 227
de ácidos nucleicos, 241
de hidratos de carbono, 238
de lípidos, 239
de proteínas, 240
Dihidro-
biopterina reductasa, 345, 350
lipoil deshidrogenasa, 268
lipoil transacetilasa, 268
orotasa, 373
1,25-dihidroxicolecalciferol, 581
Dinamina, 224
Dineína, 223
Dinorfinas, 564
Dióxido de carbono
transporte de, 96, 624
Dipeptidasas, 235
Disacáridos, 82
Disacaridasas, 235
Distribución del agua, 613
Dolicol, 109
Dolicol fosfato, 109, 284
Dominios, 45
Dopamina (DOPA), 346
β-hidroxilasa, 346
descarboxilasa, 346

E

Ecuación Henderson-Hasselbach, 17
Efecto
Bohr, 55
del ion común, 17
ionotrópico, 411
metabotrópico, 411
Pasteur, 387
Warburg, 387
Eicosanoides, 564
acciones, 565
biosíntesis de, 312
mecanismo de acción, 564
papel funcional, 315
Elastasa, 234
Electroforesis, 35
de ADN, 427
Electrólitos
débiles, 12
fuertes, 12
Elementos biógenos, 7
oligoelementos, 8, 648
primarios, 8
secundarios, 8
Elongación de ácidos grasos, 310
Enanismo de Laron, 515
Enanismo hipofisiario, 515
Enantiómeros, 24, 72

Encefalinas, 564
Endocitosis, 220
  mediada por clatrina, 220
  mediada por caveolina, 222
Endocrinología
  bases bioquímicas, 485, 509
Endonucleasas de restricción, 421
Endopeptidasa, 235
Endorfinas, 564
Endosoma temprano, 221
Endosoma tardío, 222
Endotelina, 560
Energía, 133
  en reacciones químicas, 134
  carga de, 393
  de activación, 141
  libre, 135
  estándar, 136
Enfermedad
  autoinmune, 690
  celíaca, 244
  de Addison, 533
  de Alzheimer, 476
  de Andersen, 262
  de células I, 478
  de Creutzfeldt-Jacob, 476
  de Gaucher, 318
  de Graves-Basedow, 526, 691
  de Hartnup, 243, 332
  de Hashimoto, 526
  de Huntington, 476
  de McArdle, 262
  de Niemann-Pick, 318
  de Parkinson, 476
  de Refsum infantil, 303
  de Sandhoff, 318
  de Smith-Lemli-Opitz, 323
  de Tangier, 299
  de Tay-Sachs, 318
  de von Gierke, 262
  de Zellweger, 303
  hemorrágica recién nacido, 585
  lisosomal, 285, 319
  por prion, 476
Enoil hidratasa, 301
Enoil reductasa, 310
Enolasa, 265
Equilibrio Gibbs-Donnan, 612
Entalpía, 134
Enteropeptidasa o enteroquinasa, 235
Entropía, 135
Enzimas, 143
  actividad específica, 150
  actividad molar, 150
  alostéricas, 157
  alteraciones genéticas, 149
  clasificación, 143
  condensante, 309
  constante Michaelis-Menten, 152
  constitutivas, 158
  convertidora de angiotensina, 559
  determinación de actividad, 150
    en el laboratorio clínico, 160
  distribución intracelular de, 149
  en plasma sanguíneo, 161
  factores que modifican actividad
    concentración de enzima, 151
    concentración de sustrato, 151
    pH, 153
    temperatura, 153
  inducibles, 158
  inhibidores de, 154
    anticompetitivos, 156
    competitivos, 154
    irreversibles, 154
    no competitivos, 155
    reversibles, 154
    suicidas, 154
  K_m, 152
  málica, 308
  modificación covalente, 158
  multifuncionales, 150
  naturaleza química, 146
  nomenclatura, 143
  número de recambio, 151
  procesos en cascada, 159
  ramificante, 260
  regulación de actividad, 157
  sitio activo, 148
  unidad internacional, 150
  velocidad inicial, 150
Epigenética, 464
Epimerasa, 281
Epinefrina, 346, 534
Epítopo, 663
Equilibrio
  ácido-base, 622
    trastornos del, 630
      estudios, 631
  Gibbs-Donnan, 616
  químico, 135
  constante de, 12, 136
  de Starling, 615
  hídrico, 614
    alteraciones del, 620
Equivalentes, 20
  de reducción, 171
Ergocalciferol, 580
Ergosterol, 111, 576
Eritropoyetina, 559
Errores congénitos metabol., 149
  aminoácidos, 353
  de fenilalanina y tirosina, 347
Escleroproteínas, 48
Escorbuto, 606
Escualeno, 320
Esfingofosfolípidos, 107
Esfingolipidosis, 319
Esfingomielina, 107
  biosíntesis de, 317
Especies reactivas, 189
  de oxígeno, 190
  de nitrógeno, 191
  efectos nocivos de las, 192
  mecanismos de defensa, 193
    endógenos, 193
  patología relacionada, 192
Espectrometría
  resonancia magnética, 250
Espermidina, 343
Espermina, 343
Estado
  de activación, 141
  estacionario, 152
Esteatorrea, 243
Estercobilina, 363
Estercobilinógeno, 363
Estereoisómeros, 24
Ésteres de forbol, 493
Esteroides, 110
Esteroles, 109
Estrés oxidativo, 189
Estrógenos, 547
Eucromatina, 125, 423
Exceso de base, 632
Excreción de H^+, 627
Exocitosis, 222
Exopeptidasas, 235
Exosomas, 222
Exones, 441
Expresión de concentraciones, 19

F

Fagocitosis, 220
Factor(es)
  activante de plaquetas, 106
  de crecimiento, 565
    de fibroblastos, 566
    de nervios, 566
    derivado de plaquetas, 566
    epidérmico, 566
    semejantes a insulina, 518
  de replicación, 418
  de transcripción FOXO, 503
  extrínseco, 603
  intrínseco, 232, 603
  natriurético atrial, 560
    acciones, 560
    alteraciones, 561
Farnesil pirofosfato, 321
Farnoquinona, 585
Fenilalanina, 26
  hidroxilasa, 345
Fenilcetonuria, 348
Fenómeno
  de Starling, 619
  de Zuntz-Hamburger, 626
Feocromocitoma, 346
Fermentación, 262
Fermento lab o renina, 232
Ferritina, 649
Ferroquelatasa, 360
Fibra dietaria, 87, 239
Fibrina, 698
Fibrinógeno, 58, 698
Fibrinólisis, 701
Filoquinona, 585
Fingerprinting de ADN, 432
Flavina
  adenina dinucleótido, 172, 592
  mononucleótido, 172, 592
Flavonoides, 195
Flavoproteínas, 172

Flip-flop, 199
Flipasas, 199
Flopasas, 199
Flúor, 658
  absorción, 658
  fuentes naturales, 658
  funciones, 658
  toxicidad, 658
Folistatina, 555
Formación
  de malonil-CoA , 308
  de películas lipídicas, 197
  de urea, 336
Fórmulas de Haworth, 77
Fosfatasa alcalina, 236
Fosfatidilcolina, 104
    biosíntesis de, 317
Fosfatidiletanolamina, 104
    biosíntesis de, 317
Fosfatidilinositol, 104
  biosíntesis de, 317
Fosfatidilserina, 104
  biosíntesis de, 317
Fosfo-
  adenosina fosfosulfato, 351
  diesterasa, 496
  enolpiruvato carboxiquinasa, 277
  fructoquinasa, 264, 279
  glicerato mutasa, 265
  glucoisomerasa, 264
  glucomutasa, 259
  gluconato deshidrogenasa, 276
  panteteína, 596
Fosfolambano, 66
Fosfolipasas
    A_1, 318
    A_2, 235, 318
    B, 318
    C, 318, 492
    D, 318
Fosfolípidos, 103
  biosíntesis de, 316
Fosfoproteína(s), 48
  fosfatasa, 382
Fosforilación
  a nivel de sustrato, 186
  desacoplantes de la, 182
  inhibidores de la, 182
    hipótesis quimiosmótica, 178
  oxidativa, 176
    inhibidores de la, 182
    mecanismo de la, 177
    rédito en ATP de la, 182
  potencial de, 138
Fosforilasa, 260, 381
  quinasa, 381
Fósforo, 644
  absorción, 644
  deficiencia, 645
  excreción, 644
  fosfatemia, 644
  fuentes naturales, 644
  funciones, 645
  homeostasis, 645
  ingesta recomendada, 645
  manejo renal del, 644
Fosforribosil-
  glicinamida transferasa, 368
  pirofosfato, 368
Fosfoserina, 28
Fosfotriosa isomerasa, 265, 300
Fragmentos de Okazaki, 417
Fructosa, 76
  intolerancia a la, 280
  metabolismo de, 279
  -2,6-bisfosfato, 384
Fructosa-1-P-aldolasa, 279
Fructosuria esencial, 281
Fucosa, 80
Fuerzas de van der Walls, 44
Fumarasa, 272
Fumarato hidratasa, 272
Furano, 75

G

Galanina, 558
Galactoquinasa, 280
Galactosa, 76
  metabolismo de, 281
Galactosa-1-P-uridiltransferasa, 281
Galactosemia, 282
γ-glutamil
  ciclo transferasa, 352
  cisteína sintetasa, 353
  transferasa, 352
Gangliósidos, 108
  biosíntesis de, 317
Gastrina, 556
Gen(es)
  clonación de, 433
  familia de, 441
  mutaciones de, 458
  regulación de la expresión, 453
  repetidos, 441
  supresores de tumores, 463
Genoma, 125, 442
  humano, 442
Geranil pirofosfato, 321
Girasa, 416
Glándula pineal, 563
Gliadinas, 47
Glicerofosfato-
  aciltransferasa, 315
  deshidrogenasa, 300
Glicerofosfolípidos, 103
  propiedades de, 105
Gliceroneogénesis, 315
Gliceroquinasa, 299, 315
Glicina, 26
Glicocálix, 203
Glicolípidos, 108
Glicoproteínas, 48, 89
  degradación de, 287
  moléculas señalizadoras, 92
Glicosaminoglicanos, 86
Glicósidos, 79
Glicosil-fosfatidil-inositol, 201
Globina, 52
Globósidos, 108
Globulinas, 47, 60
  γ o inmunoglobulinas, 61
Gomas, 88
Glucagón, 543
  acciones, 543
  mecanismo de acción, 543
Glucemia, 282
  alteraciones de la, 282, 545
  homeostrasis de la, 282, 544
  regulación hormonal, 544
Glúcidos, 71
Glucogenina, 259
Glucógeno, 84
  fosforilasa, 260, 381
  papel funcional, 261
  sintasa quinasa 3, 382
  sintasa, 259
  síntesis, 259
Glucogenogénesis, 258
  costo energético, 260
  regulación de, 382
Glucogenólisis, 260
  regulación, 381
Glucogenosis, 261
Glucólisis, 262
  balance energético, 266
  irreversibilidad de la, 267
  papel funcional, 267
  primera fase, 263
  segunda fase, 265
  regulación, 383
Gluconeogénesis, 277
  consideraciones generales, 279
  costo energético de la, 279
  regulación, 383
Gluconolactona hidrolasa, 276
Glucoquinasa, 258, 264
Glucosa, 73
  estructura cíclica de, 74
  fosforilación de, 257
  ingreso a las células, 256
  metabolismo, 262
    balance energético, 275
  prueba de tolerancia a, 282, 547
  transportadores de, 207, 256
Glucosa-1-P-uridiltransferasa, 259
Glucosa-6-fosfatasa, 261, 278
Glucosa-6-P-deshidrogenasa, 276
Glutamato
  desaminación de, 334
  deshidrogenasa, 334
Glutamil-cisteína sintetasa. 352
Glutamilo
  ciclo de, 352
Glutamina, 27
  formación de, 335
  PRPP amidotransferasa, 368
  sintetasa, 335
Glutatión, 33, 352
  peroxidasa, 194
  reductasa, 194
  síntesis de, 352
  sintetasa, 352, 353

S-transferasa, 362
Glutelinas, 47
Gónadas, 548
Gota, 371
Gradiente, 205
Granzimas, 687
Grasa/s
beige, 184
en la alimentación, 102
neutras, 100
parda, 184
Grelin, 558
Grupo prostético, 48
Grupos sanguíneos, 92
Guanasa, 370
Guanina, 115
Guldberg y Waage, 136

H

Haptoglobina, 650
HDL, 296
Hebra de ADN
antisentido, 422
con sentido, 422
líder o conductora, 417
rezagada, 417
Helicasa, 415
Hélice α, 40
Hélice-giro-hélice, 468
Hematina, 56
Hemicelulosas, 88
Hemo, 51
biosíntesis del, 357
catabolismo del, 361
metabolismo del, 357
oxigenasa, 361
Hemocromatosis, 652
Hemofilia, 696
Hemoglobina, 50
A_1, 52
A_{1c}, 57
A_2, 52
anormales, 57
curva disociación del O_2, 53
derivados de, 56
embrionarias, 52
estructura cuaternaria de, 52
estructura de, 53
fetal, 52
funciones de, 53
Hemoproteínas, 50
Hemosiderina, 650
Hemostasis, 695
Heparansulfato, 87
Heparina, 87
Heterocromatina, 124, 423
Heteropolisacáridos, 86
Hexoquinasa, 258, 264, 280
Hidratos de carbono, 71
clasificación de, 71
de membranas, 203
isomería, 72
Hidrolasas, 145
Hidrólisis, 23
Hidronio, 13
Hidroxiapatita, 644
Hidroxilisina, 28
3-OH-acil deshidratasa, 310
3-OH-butirato deshidrogenasa, 305
3-OH-3-metilglutaril
-CoA liasa, 305
-CoA reductasa, 320
-CoA sintasa, 304, 320
Hidroxiprolina, 28
Hierro, 647
absorción, 648
almacenamiento, 650
anemia ferropriva, 652
balance del, 648
deficiencia, 651
digestión, 648
excreción, 651
fuentes naturales, 647
homeostasis del, 650
requerimientos, 651
sobrecarga de, 652
transferencia a tejidos, 649
transporte en sangre, 649
Hiperhidratación, 621
Hipercloridria, 233
Hipercolesterolemia familiar, 298
Hipertriacilgliceridemia, 298
Hipoclorhidria, 233
Hipófisis, 511
Hipoglucemiantes orales, 547
Hipotálamo, 511
hormonas liberadoras de, 511
corticotrofina, 512
gonadotrofinas, 512
h.de crecimiento, 513
h. melanocitoestimulante, 513
prolactina, 513
tirotrofina, 512
Hipoxantina, 370
Histamina, 342, 563
Histidina, 28
descarboxilasa, 342
Histonas, 47, 123
H^+,K^+-ATPasa, 216, 230
Holoenzima, 146
Homocisteína, 344
Homopolisacáridos, 83
Homoserina, 28
Hormona/s, 509
adrenocorticotrofica, 515
antidiurética, 521
foliculoestimulante, 515
gastrointestinales, 561
amilina, 563
colecistoquinina, 562
de crecimiento, 517
enteroglucagón, 562
galanina, 562
gastrina, 561
ghrelin, 562
péptido intest. vasoactivo, 562
secretina, 561
lactogénica, 516
luteinizante, 515
métodos de determinación, 510
naturaleza química, 509
propiedades generales, 510
reguladoras del hipotálamo, 507
tipos de acciones de, 509
Horquilla de replicación, 415

I

Ictericia, 363
Iminoácido, 28
Impacto glucémico, 283
Impronta genética, 464
Impulso nervioso, 410
Indicán urinario, 350
Índice glucémico, 283
Información genética, 413
Inhibidores
de enzimas, 154
de transporte de electrones, 176
Inmunidad, 661
celular, 680
humoral, 662
bases moleculares, 661
Inmunodeficiencias
adquiridas, 690
congénitas, 689
severa combinada, 371
Inmunoelectroforesis, 59
Inmunoglobulinas, 61, 664
cadenas livianas, 664
disposición genes de, 666
cadenas pesadas, 664
disposición genes de, 669
de membrana, 668
diversidad genética, 669
estructura, 664
fragmentos Fab y Fc, 666
genes de, 673
secuencias reguladoras, 673
isotipos cadenas pesadas, 666
síntesis de diferentes, 668
selección clonal, 668
superfamilia de, 225
Inmunoelectroforesis, 59
Intercambiador, 206
de cationes y aniones, 208
Interferencia por ARN, 470
Inositol, 104, 609
-1,4,5-trisfosfato, 496
Insulina, 537
acciones metabólicas, 541
paracrinas, 543
alteraciones, 543
biosíntesis, 538
degradación, 539
mecanismo de acción, 539
receptor, 539
sustratos del receptor, 539
resistencia a la, 546
secreción, 538
Integración metabólica, 377
Integrinas, 225

Interacciones metabólicas, 392
Intercambiadores
de cationes y aniones, 208
Interconversión
glúcidos-lípidos-aminoácidos, 378
Interferón, 688
Intermediario de transición, 141, 148
Intrones, 441
Inulina, 85
Ion hidronio, 13
Ionóforos, 182, 211
Isocitrato deshidrogenasa, 271
Isoenzimas o isozimas, 159
Isoleucina, 26
Isomaltasa, 235
Isomerasas, 145
Isomería óptica, 24, 72
Isopentenil pirofosfato, 321
Isoprenos, 109

J

Jabones, 98
Joule, 134
Jugo gástrico, 229
acciones digestivas, 231
alteraciones, 232
análisis de, 232
Jugo pancreático, 233
acciones digestivas, 233
componentes inorgánicos, 233

K

Kernícterus, 364
K_m, 152

L

Lactasa-florizina hidrolasa, 235
Lactato deshidrogenasa, 266
Lactonasa, 276
Lactosa, 82
intolerancia a la, 239
Lámina β, 42
Lanosterol, 321
Lanzadera(s), 184
aspartato-malato, 184
de citrato, 307
glicerofosfato, 184
Lecitina, 104
colesterol-aciltransferasa, 296, 321
Lectinas, 92, 204
Leptina, 316
Leucina, 26
Ley
de Guldberg y Waage, 136
de Henry, 620
de Pick, 205
Leucotrienos, 312, 564
Liasas, 145
Licopeno, 195
Ligandina, 362
Ligando, 51
Ligasas, 145
Lignina, 88
Linfocitos B, 662
activación, 684
Linfocitos T, 679
acción lítica de, 686
activación, 685
Lipasa
hepática, 295
gástrica, 232
pancreática, 234
salival, 229
Lípidos, 95
clasificación, 95
complejos, 103
degradación de, 318
alteraciones congénitas, 318
de membranas, 197
de tejidos, 299
metabolismo de, 291
sanguíneos, 292
simples, 100
sustancias asociadas, 109
Lipólisis, 389
Lipooxigenasas, 314
Lipoproteína(s), 48, 61, 109
(a), 296
alta densidad HDL), 296
remoción de, 296
baja densidad (LDL), 295
densidad intermedia (IDL), 295
del plasma, 292
muy baja densidad (VLDL), 294
lipasa, 294, 295, 319
y aterosclerosis, 297
Liposomas, 198
Líquido extracelular, 614
regulación de osmolalidad, 620
regulación del volumen, 620
Lisina, 27
Lisoderivados, 106
Lisosomas, 204, 328
Luz polarizada, 24

M

Macrominerales, 635
Macxropinocitosis, 220
Magnesio, 645
absorción, 646
alteraciones, 647
excreción, 646
fuentes naturales, 646
funciones, 646
homeostasis, 646
ingesta recomendada, 647
magnesemia, 646
manejo renal del, 646
Malato deshidrogenasa, 272, 307
Malondialdehído, 192
Malonil transferasa, 309
Maltosa, 82
Manganeso, 656
absorción, 656
deficiencia, 656
excreción, 656
fuentes naturales, 656
funciones, 656
transporte, 656
Manosa, 76
Mapas metabólicos, 2
MAP quinasas, 495
Masa molecular, 32
Mediador, 425, 470
Medicina personalizada, 459
Médula suprarrenal, 534
hormonas, 534
acciones, 536
alteraciones, 537
biosíntesis, 534
inactivación, 535
mecanismo de acción, 536
secreción, 535
Melanina
síntesis de, 347
Melatonina, 563
síntesis de, 349
Membranas, 197
carbohidratos de, 203
constitución de, 198
estructura de, 197
inserción de proteínas en, 202
lípidos de, 197
proteínas de, 200
Menadiona, 586
Menaquinona, 585
Mesobilirrubinógeno, 363
Metabolismo, 247
compartimentalización, 252
errores congénitos del, 353
papel distintos órganos, 340
de aminoácidos, 327
de colesterol, 319
regulación del, 391
de etanol, 402
de fenilalanina, 345
errores congénitos, 347
de fructosa, 280
de galactosa, 281
de grasas, 299
de hidratos de carbono, 255
en hígado, 399
del hemo, 357
del glicerol, 299
de lípidos, 291
de lipoproteínas, 294
de pirimidinas, 367
de purinas, 367
biosíntesis de, 367
de tirosina, 345
de triptófano, 348
en algunos tejidos, 397
hígado, 397
biotransformación, 400
músculo esquelético, 404
músculo cardíaco, 408
tejido adiposo, 409

tejido nervioso, 410
estudios del, 249
integración, 377
regulación, 251, 378
ejemplos, 380
Metaboloma, 250
Metahemoglobina, 51, 56
Metahemoglobinemia, 57
Metaloenzimas, 147
Metaloproteínas, 48
Metionina, 27
Mevalonato, 320
Micelas, 11, 198
Michaelis-Menten, 151
MicroARN, 471
biogénesis de 471
Microarrays, 458
Micromatrices, 458
Miliequivalentes, 20
Minerales esenciales, 631
Mioglobina, 54
Miosina, 64
Mitocondrias, 170, 204
ADN de, 125
Mixedema, 521
Mol, 19
Molalidad, 20
Molaridad, 19
Moléculas de adhesión celular, 224
Molibdeno, 657
absorción, 657
deficiencia, 658
excreción, 658
fuentes naturales, 657
funciones, 658
transporte, 658
Mono-ADP-ribosilación, 474
Monoamino oxidasa, 346, 349
Monooxigenasas, 187
Monosacáridos, 71
de interés, 73
derivados de, 79
Monóxido de carbono, 56, 565
Muciflagos, 88
Mucopolisacaridosis, 287
Mucosa intestinal, 235
disacaridasas de, 235
endopeptidasas de, 235
enteropeptidasa, 235
exopeptidasas de, 235
enzimas de borde en cepillo, 235
fosfatasa de, 235
alcalina, 235
lactasa-florizina hidrolasa, 235
persistencia de, 239
maltasa-glucoamilasa, 235
nucleasas de, 235
nucleosidasas, 235
sacarasa-isomaltasa, 235
trehalasa, 235
Mucus gástrico, 232
Muerte celular programada, 703
Músculo
contracción del, 66
estructura del, 63
Mutaciones genéticas, 453
agentes de, 455
deleción, 454
dirigidas, 148
duplicación, 45
frecuencia de, 455
inversión, 454
puntuales, 453
Mutarrotación, 74

N

NAADP, 594
NAD, 171
NADH ubiquinona reductasa, 172
NADP, 171
NADPH
citocromo P_{450}
oxidasa, 190
reductasa, 187
Nebulina, 66
Neurohipófisis, 520
arginina-vasopresina, 521
oxitocina, 520
Neurotransmisores, 567
aceticolina, 567
aminoácidos, 563
catecolaminas, 568
dinorfinas, 569
encefalinas, 569
endorfinas, 569
histamina, 568
monóxido de carbono, 570
neuropéptidos, 568
opioides endógenos, 569
óxido nítrico, 569
purinas, 568
serotonina, 568
sustancia P, 569
Niacina, 593
absorción intestinal, 593
acciones farmacológicas, 595
avitaminosis, 595
fuentes naturales, 593
metabolismo, 594
papel funcional, 594
química, 593
requerimientos, 595
sinonimia, 593
Nicotinamida, 593
adenina, 115
dinucleótido, 171, 593
fosfato (NADP), 171
mononucleótido, 171, 593
Nictalopía, 578
Ninhidrina, 31
Noradrenalina, 346, 534
Norepinefrina, 534
Nucleasas, 236
Núcleo, 204
Nucleoproteínas, 48
Nucleósido(s), 116
difosfatoquinasa, 260, 271, 374
di- y trifosfato, biosíntesis, 374
fosforilasa, 370
monofosfato quinasa, 374
síntesis de, 374
Nucleosoma, 123
Nucleótidos, 115
libres, 130
Nucleótido azúcares, 283
Número de Avogadro, 19
Número de yodo, 99

O

Obesidad, 315
Oligoelementos, 652
Oligofrenia fenilpirúvica, 348
Oligosacáridos, 89
biosíntesis de, 284
Oncogenes, 461
Operón, 467
Opioides endógenos, 564
Organelas subcelulares, 204
Organismos
autótrofos, 2
fotótrofos, 165
heterótrofos, 2
quimiótrofos, 165
Ornitina, 28, 336
transcarbamilasa, 336
Osteogénesis imperfecta, 50
Osteomalacia, 583
Osteoporosis, 642
Ovario, 551
hormonas, 551
acciones, 553
andrógenos, 553
estrógenos, 553
biosíntesis, 551
metabolismo, 551
hormonas peptídicas, 554
activina, 554
folistatina, 555
inhibina, 554
relaxina, 554
progesterona, 551
acciones, 553
variaciones niveles, 554
Oxidación, 167
Oxidación de ácidos grasos
balance energético, 304
en peroxisomas, 303
insaturados, 303
Oxidaciones biológicas, 165, 169
Oxidaciones celulares
regulación, 392
Oxidación-reducción, 166
Óxido nítrico, 191, 350, 564
sintasa, 350
síntesis de, 350

Oxidorreductasas, 144
Oxigenasas, 144
de función mixta, 187
Oxígeno singulete o singlete, 190

P

Páncreas, 537
hormonas, 537
Paratiroides, 555
alteraciones de, 557
calcitonina, 558
acciones, 558
hormona paratiroidea, 555
acciones, 556
degradación, 556
proteína relacionada con, 557
secreción, 555
mecanismo de acción, 556
uso terapéutico, 557
Paratopo, 661
Pascal, 53
Patch clamp, 209
PCR, 430
a tiempo real, 431
Pectinas, 88
pH de líquidos corporales, 622
regulación, 623
renal, 627
respiratoria, 626
pH intracelular
regulación del, 629
Pelagra, 595
Pentosas, 77
Pepsina, 231
Pepsinógeno, 231
Peptidiltransferasa, 449
Peptidoglicanos, 89
Péptido(s), 32
de importancia, 33
intestinal vasoactivo, 557
natriurético atrial, 556
nomenclatura de, 32
propiedades ácido-base, 33
Peróxido de hidrógeno, 190
Peroxisomas, 204
pH de líquidos corporales, 622
Pigmentos
biliares, 238
urinarios, 363
Pilas electroquímicas, 168
Pineal, 558
melatonina, 558
Pinocitosis, 220
Pirano, 75
Piridoxal, 597
Piridoxamina, 597
Piridoxina, 597
absorción intestinal, 598
avitaminosis, 598
fuentes naturales, 597
metabolismo, 598
papel funcional, 598
química, 597
requerimientos, 598
sinonimia, 597
transporte, 598
Pirimidina(s), 115
biosíntesis de, 372
catabolismo de, 374
metabolismo de, 367
Pirofosfato de tiamina, 589
Piruvato
carboxilasa, 277, 308
descarboxilacion oxidativa, 268
regulación, 387
descarboxilasa, 268
deshidrogenasa, 268
quinasa, 265
Placenta, 520
gonadotrofina coriónica, 520
lactógeno, 520
Plasmalógenos, 105
Plásmidos, 125, 428
Poli-ADP-ribosilación, 475
Poliprenoles, 109
Polisacáridos, 82
Polisomas, 451
Porfina, 51
Porfirias, 360
adquiridas, 361
aguda intermitente, 360
cutánea tardía, 360
eritropoyética, 360
Porfirina, 51
formación de, 358
Porfobilinógeno, 358
sintasa, 358
síntesis de, 358
Porina, 170
Portadores, 205
Potasio, 637
absorción, 637
alteraciones homeostasis, 638
e hipertensión arterial, 638
excreción, 633
fuentes naturales, 637
ingesta recomendada, 638
manejo renal del, 637
regulación, 637
Potencial,
de acción, 411
de reducción, 167
determinación, 167
de reposo, 410
de transferencia fosforilo, 138
postsináptico, 411
protón-motriz, 178
Presión
oncótica, 618
osmótica líquidos corpor., 617
Primasa, 416
Primer, 416
Prion, 472
Proenzimas, 149
Procesividad, 418
Procesos en cascada, 159
Progesterona, 547
Prolina, 28
Promotor, 424
Proopiomelanocortina, 514
Prostaciclinas, 312, 564
Prostaglandinas, 312, 564
ciclooxigenasa, 313
endoperóxido sintasa, 313
Protaminas, 47
Proteasoma, 328
Proteína(s), 34
A de replicación, 416, 418
antiapoptóticas, 704
biosíntesis de, 439, 446
acción de antibióticos, 451
iniciación de, 447
clasificación de, 47
conjugadas, 48
cuaternaria, 44
degradación de, 328
del músculo, 63
del plasma sanguíneo, 58
albúmina, 60
electroforesis de, 59
funciones de, 63
globulinas, 60
inmunoglobulinas, 61, 660
lipoproteínas, 61, 292
síntesis de, 63
desnaturalización, 47
determinación, 38
disposición al azar, 42
en alimentación, 48
estructura
cuaternaria, 44
primaria, 37
determinación, 38
importancia de, 38
secundaria, 39
disposición al azar, 42
hélice α, 40
lámina β, 42
terciaria, 43
y función, 49
fibrilares, 37
forma molecular, 37
fosfatasas, 503
G, 490
globulares, 37
hélice α, 40
Hsp, 476
importancia de la, 38
integrales, 200
lámina β, 42
masa molecular de, 35
modificaciones
postraducción, 477
postranscripción, 473
periféricas, 201
plegamiento , 475
defectuoso, 476
primaria, 37
proapoptóticas, 704
propiedades ácido-base, 34
propiedades generales de, 34
punto isoeléctrico de, 30
quinasas, 503

quinasa A, 381
quinasa B, 494
quinasa C, 493
Ras, 495
regulatorias, 468
requerimiento de, 330
simples, 47
síntesis de, 327
SNARE, 224
solubilidad de, 36
efecto del pH, 36
efecto de sales, 36
solventes apolares, 36
terciaria, 43
tránsito en la célula, 477
transportadora acilos, 308, 596
valor biológico, 48, 330
vida media de, 328
Wnt, 503
Proteoglicanos, 88
degradación de, 287
Proteoma, 458
Protoporfirina III, 51
Protrombina, 697
Proyecto genoma humano, 442
Prueba tolerancia a glucosa, 547
Ptialina, 229
Puente de hidrógeno, 10, 40
Purina(s), 115, 563
catabolismo de, 370
metabolismo de, 367
regulación, 369
vía de recuperación, 369
Púrpura visual, 574
Putrefacción bacteriana, 350
Putrescina, 342

Q

Queratansulfato, 87
Queratinas, 50
Quilomicrones, 294
remanentes de, 294
Quimotripsina, 234
Quinesina, 223
Quitina, 86

R

Radical libre, 189
hidroxilo, 191
peróxido, 191
Raquitismo, 583
Reacción
en cadena de polimerasa, 431
endergónica, 137
endotérmica, 134
exotérmica, 134
exergónica, 137
Reacción química
cambio de energía en, 134
de orden cero, 140
de primer orden, 140
energéticamente acoplada, 139
orden de, 140
sentido de la, 135
Receptor(es), 485
activado prolifer. peroxisomas, 488
asociados
a guanilato ciclasa, 493
a proteínas G, 489
a serina-treonina quinasa, 492
a tirosina fosfatasas
a tirosina quinasa extrínseca, 488
de células T, 675
de citoquinas, 683
de esteroides, 487
de HDL, 297
de insulina, 487, 531, 535
de membrana plasmática, 489
de neurotransmisores, 504
colinérgicos, 504
dopaminérgicos, 506
muscarínicos, 505
nicotínicos, 504
de remanentes, 297
desensibilización, 493
de sulfonilurea, 217
proteína quinasa intrínseca, 491
intracelulares, 487
LDL, 295, 297
LRP, 294, 297
nucleares, 488
recolector de residuos, 297
tiroideos, 488
tirosina fosfatasas, 493
TLR (toll-like receptor), 661
Recuperación de purinas, 369
Reducción de oxígeno, 179
Regulación
Regulación
de la apoptosis, 705
expresión génica, 467
en eucariotas, 467
a nivel de traducción, 470
postraducción, 470
postranscripción, 470
transcripción, 468
excreción de H^+, 631
metabólica de, 251, 378
ácidos grasos, 389
biosíntesis de colesterol, 391
biosíntesis de purinas, 369
ciclo ácido cítrico, 388
compuestos nitrogenados, 391
descarboxilación piruvato, 387
glucogenogénesis, 382
glucogenólisis, 381
glucólisis, 383
gluconeogénesis, 383
lipólisis, 389
osmolalidad líquido extracel., 620
volumen líquido extracelular, 620
oxidaciones celulares, 392
de pH intracelular, 629
Regulador
fibrosis quística conductancia, 217
Relación
de intercambio respiratorio, 410
P:O, 177
Relaxina, 550
Reparación de ADN, 419
Replicación de ADN, 413
mecanismo de, 416
Replisoma, 416
Restos monocarbonados
transferencia de, 343
Restrictasas, 421
Retículo endoplásmico, 204
Retinal, 575
Retinol (ver vitamina A), 575
Retinoides, 575
Ribitol, 79
Riboflavina, 591
absorción intestinal, 592
avitaminosis, 592
fuentes naturales, 591
metabolismo, 592
papel funcional, 592
química, 591
requerimientos, 592
sinonimia, 591
Ribonucleasas, 234, 418
Ribonucleoproteínas
nucleares pequeñas, 128, 443
Ribonucleósido(s),
difosfato reductasa, 374
Ribosomas, 128
Ribosa, 116
Riboswitches, 473
Ribozimas, 146, 446
Riñón
hormonas de, 558
bradiquinina, 560
calcitriol, 560
endotelina, 560
eritropoyetina, 559
renina, 558
urodilatina, 560
Rodopsina, 574

S

Sacarasa-isomaltasa, 235
Sacarosa, 82
Sales biliares, 236
Saliva, 227
acciones digestivas, 229
composición, 227
funciones, 229
Saponificación, 101
Sarcosina, 28
Selectinas, 225
Selenio, 656
absorción, 657
deficiencia, 657
fuentes naturales, 657
funciones, 657
metabolismo, 657
transporte, 657
Serina, 26
proteasas, 234

Serotonina, 348
biosíntesis de, 348
Seudogenes, 441
Siderofilina, 649
Síndrome
adrenogenital, 534
de Angelman, 464
de Crigler-Najjar, 364
de Cushing, 534
de Ehlers-Danlos, 50
de Gilbert, 364
de Leigh, 184
de Lesch-Nyhan, 370
de Prader-Willi, 464
de reperfusión, 192
de Reye, 183
de de Toni-Debré-Fancon i, 184
de Wernicke-Korsakoff, 591
de Zellweger, 303
metabólico, 547
Síntesis de
ácido nicotínico, 349
ARN de transferencia, 425
ARN precursor de mensajero, 424
ARN ribosomal, 426
ATP en el complejo F_0F_1, 181
creatina, 351
melanina, 347
melatonina, 349
Sistema(s)
buffer del organismo, 623
regulación renal, 623
regulación respiratoria, 622
conmutadores hidrógeno, 184
aspartato-malato, 184
glicerofosfato, 184
de transducción de señales, 493
AMP cíclico, 498
Crosstalk, 503
fosfatidilinositolbisfosfato, 496
GMP cíclico, 494
inmunitario, 661
adaptativo, 662
innato, 661
patología relacionada, 689
JAK-STAT, 500
lípidos en, 498
quinasas MAP, 499
Ras, 499
relaciones entre, 503
señal de Ca^{2+}, 501
TOR, 500
de transporte electrones, 171, 186
inmunitario, 657
adaptativo, 658
innato, 658
patología relacionada, 686
lanzadera, 184
melanocortina, 514
multienzimáticos, 150
microsomal oxidante, 413
renina-angiotensina, 554
Sitio activo, 148
catalítico, 148
Sodio, 635
absorción, 635
alteraciones homeostasis, 636
e hipertensión arterial, 636
fuentes naturales, 635
manejo renal del, 636
necesidades diarias, 636
excreción, 636,
Soluciones
amortiguadoras, 16
mecanismo de acción, 16
pH de las, 17
neutras, 14
Somatostatina, 513, 544
Sorbitol, 79
Sorbitol deshidrogenasa, 280
Southern blotting, 430
Splicing, 443
diferencial, 444
alteraciones, 444
Succinato
tioquinasa, 271
ubiquinona reductasa, 172
Succinil-CoA-
3-cetoácido-transferasa, 305
Sulfátidos, 108
Sumoilación, 480
Superhélice, 49, 123
Superóxido dismutasa, 193
Suprarrenales, 527
Surfactante, 106
Sustrato, 143

T

Tabla periódica elementos, 5
Talasemias, 58, 444
Taurina, 608
funciones, 608
usos sin fundamento, 608
Telomerasasas, 420
Telómeros, 124
Terapia génica, 435
Termodinámica, 133
primera ley de, 133
segunda ley de, 133, 134
Termogenina, 184
Terpenos, 109
Testículo, 548
acciones, 550
alteraciones clínicas, 551
hormonas, 548
mecanismo de acción, 550
Testosterona, 548
biosíntesis, 548
metabolismo, 550
Tetrahidrobiopterina, 345
Tiamina, 589
absorción intestinal, 590
avitaminosis, 590
fuentes naturales, 589
metabolismo, 590
papel funcional, 590
química, 589
requerimientos, 590
sinonimia, 589
transporte, 590
usos terapéuticos, 591
Timina, 115
Tioforasa, 305
Tiolasa, 302, 305
Tiolesterasa, 308
Tioquinasa, 300, 305
Tiorredoxina, 374
reductasa, 374
Tiramina, 343
Tiroides, 522
hormonas tiroideas, 522
acciones, 525
alteraciones, 525
biosíntesis, 522
degradación, 520
mecanismo de acción, 524
secreción, 523
transporte en plasma, 524
Tirosina, 26
Tiroxina (T_4), 28, 317
Tocoferoles, 583
Tocotrienoles, 583
Topoisomerasas, 415
Torr, 53
Transaminación, 332
Transaminasas, 332
Transcortina, 530
Transcripción, 422
activadores y represores, 424
"empaquetamiento" ADN, 423
en eucariotas, 423
enhancers, 424
invertida, 426
en procariotas, 422
factores de, 423, 424
regulación de la, 454
mediador, 455
proteínas regulatorias, 454
Transcriptasa inversa, 426
Transcriptoma, 445
Transferasas, 144
Transferencia
de equivalentes de reducción, 171
de restos monocarbonados, 343
Transferrina, 649
Transgénesis, 457
Transhidrogenasa, 172
Tránsito de proteínas en la célula, 481
Translational medicine, 439
Translocación de protones, 178
Transportadores
ABC, 217
de difusión facilitada, 207
de glucosa, 207
dependientes de H^+, 219
dependientes de gradiente Na^+, 218
de urea, 207
independientes de gradiente Na^+, 219
Transporte
activo, 213
secundario, 217
dependiente de Na^+, 218
ATP-ADP, 181

a través de membranas, 204
de aminoácidos, 332
de anhídrido carbónico, 56
de electrones
inhibidores, 176
de múltiples drogas, 217
invertido de colesterol, 296
pasivo, 206
vesicular, 223
Transposones, 455
Trastornos equilibrio ácido-base, 626
estudios de laboratorio, 627
Trehalasa, 235
Trehalosa, 82
Treonina, 26
Triacilgliceroles, 100
biosíntesis de, 315
Trifosfato de tiamina, 585
Triosafosfato isomerasa, 265
Triosaquinasa, 279
Tripsina, 234
Tripsinógeno, 234
Triptamina, 343
Triptófano, 27, 348
hidroxilasa, 348
Triyodotironina (T_3), 517
Trombina, 697
Trombocitina, 348
Trombonina, 348
Tromboxanos, 312, 564
Tropocolágeno, 50
Tropomiosina, 65
Troponina, 65

U

Ubicuitina, 328
Ubiquinona, 173
citocromo c reductasa, 174
UDP-galactosa-4-epimerasa, 281
Ultracentrifugación, 35
Ultrafiltración, 37
Unión peptídica, 32
Uracilo, 116
Urea
ciclo de, 336
transportadores de, 207
Uricasa, 370
Urobilina, 383
Urobilinoides, 363
Urodilatina, 560
Uropepsina, 231
Uroporfirinógenos, 358
III cosintasa, 360
descarboxilasa, 360
I sintasa, 360

V

Valina, 26
Valor biológico de proteínas, 331
Varioma, 456
Vesículas, 223
traslación en la célula, 224
VLDL, 294
Vía(s) metabólica(s), 247
anabólicas, 248
anfibólicas, 248
catabólicas, 248
de aminoácidos, 344
de Embden-Meyerhoff, 262
de hexosa monofosfato, 275
significación funcional, 277
del amoníaco, 335
de pentosa fosfato, 276
de recuperación de purinas, 369
Vida media de proteínas, 328
Virión, 129
Viroides, 130
Virus, 128
mecanismo de acción, 460
Vitamina(s), 573
acciones farmacológicas, 575
antivitaminas, 574
aporte recomendado, 574, 575
avitaminosis, 574
hidrosolubles, 589
liposolubles, 575
nomenclatura, 573
papel funcional, 573
propiedades generales, 573
provitaminas, 574
requerimientos, 575
Vitamina A, 575
absorción intestinal, 576
acciones farmacológicas, 579
avitaminosis, 579
efectos tóxicos, 579
fuentes naturales, 576
metabolismo, 577
papel funcional, 577
química, 575
requerimientos, 578
sinonimia, 575
transporte en sangre, 577
Vitamina B_1 (ver tiamina), 585
Vitamina B_2 (ver riboflavina), 591
Vitamina B_3 (ver niacina), 593
Vitamina B_5 (ver ác. pantoténico), 595
Vitamina B_6 (ver piridoxina), 597
Vitamina B_7 (ver biotina), 599
Vitamina B_9 (ver ác. fólico), 600
Vitamina B_{12} (ver cobalamina), 602
Vitamina C, 195, 605
absorción intestinal, 606
acciones farmacológicas, 607
avitaminosis, 606
fuentes naturales, 605
metabolismo, 606
papel funcional, 606
química, 605
requerimientos, 606
sinonimia, 605
Vitamina D, 579
absorción intestinal, 580
aplicaciones farmacológicas, 583
avitaminosis, 583
efectos tóxicos, 583
fuentes naturales, 580
metabolismo, 580
papel funcional, 581
química, 579
requerimientos, 582
sinonimia, 579
transporte, 580
Vitamina E, 583
absorción intestinal, 584
acciones farmacológicas, 585
avitaminosis, 585
fuentes naturales, 583
metabolismo, 584
papel funcional, 194, 584
química, 583
requerimientos, 585
sinonimia, 583
transporte, 584
Vitamina K, 585
absorción intestinal, 586
acciones farmacológicas, 589
antivitaminas, 588
avitaminosis, 588
fuentes naturales, 586
metabolismo, 587
papel funcional, 587
química, 585
requerimien tos, 588
sinonimia, 585
transporte, 586

W

Warfarina, 588

X

Xantina,
oxidasa, 370
Xerodermia pigmentosa, 420
Xeroftalmía, 579

Y

Yodo, 655
absorción, 655
deficiencia, 655
fuentes naturales, 655
funciones, 655
metabolismo, 522
transporte, 655

Z

Zimógenos, 149
Zinc, 652
absorción, 652
almacenamiento, 653
deficiencia de, 653
excreción, 653
funciones, 653
fuentes naturales, 652
transporte, 653
Zwitterion, 104